UNTERSUCHUNGEN ZUR PRIMÄRSTRUKTUR DER UNTEREINHEIT DES HÜLLPROTEINS DES BAKTERIOPHAGEN FD

KONRAD BEYREUTHER

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0018

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

Untersuchungen zur Primärstruktur der Untereinheit des Hüllproteins des Bakteriophagen fd

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von
Konrad Beyreuther
aus
Feldkirchen bei München

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Braunitzer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 2. 12. 1968

Dissertationsdruck Réssy · München

Meinem Bruder Gottfried

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Braunitzer am Max-Planck-Institut für Biochemie in der Zeit vom Juli 1965 bis Februar 1968 durchgeführt.

Herrn Professor Dr. A. Butenandt danke ich sehr für die großzügige Förderung meiner Arbeit und Herrn Professor Dr. G. Braunitzer für die Einführung in die Proteinchemie, sowie für seine vielen Anregungen und Ratschläge.
Herrn Dr. J. Engel danke ich für die Einführung in die Methode der Optischen Rotationsdispersion.
Für die Durchführung der Aminosäureanalysen danke ich Frau K. Steinhoff und Herrn A. Stangl.
Fräulein I. Vahrenkamp danke ich für die Hilfe bei der Aufzucht der Phagen.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Einleitung		1
Allgemeiner Teil		
I.	Der Bakteriophage fd	
	A. Aufzucht	5
	B. Reinigung	5
II.	Das Hüllprotein des Phagen fd	
	A. Darstellung	6
	B. Tryptische Spaltung	7
	C. Physikalisch-Chemische Untersuchungen	10
III.	Salzsäurespaltung des Hüllproteins	
	A. Spaltung	15
	B. Trennung und Reinigung der Peptide	16
IV.	Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheit	26
V.	Die Bruttoformel des fd-Hüllproteins	28
VI.	Chemische Umsetzungen am Hüllprotein	32
VII.	Bestimmungen von Sequenzen	
	A. Peptide aus der Salzsäurespaltung	37
	B. Peptide aus der Spaltung mit Thermolysin	39
VIII.	Sequenz der Untereinheit des Hüllproteins	
	A. Überlappungspeptide	45
	B. Sequenz der Hüllproteinuntereinheit	46
IX.	Hüllproteine fd-ähnlicher Phagen	
	A. Hüllproteine der Phagen f 1, M 13 und ZJ 2	54
	B. Sequenzermittlung des Hüllproteins von f 1	56

Seite

X. Diskussion

A. Mögliche Fehlerquellen 61
B. Betrachtung zum Ergebnis 62

Experimenteller Teil

I. Phagenaufzucht, Reinigung und Isolierung des Hüllproteins

A. Darstellung des Phagen und des Hüllproteins 67
B. Quantitative Bestimmung der C-terminalen Aminosäure durch Hydrazinolyse 69
C. Optische Bestimmungen 70

II. Reaktionen am Hüllprotein

A. Acylierung reaktiver Gruppen mit bekannten Acylierungsmitteln 71
B. Acylierung mit Tetrafluorbernsteinsäure-anhydrid (TFBA) 72

III. Spaltungen des Hüllproteins

A. Enzymatische Spaltung 73
B. Salzsäurespaltung 74

IV. Reinigungsmethoden für Peptide

A. Angewandte Methoden 75
B. Ionenaustauscherchromatographien 76
C. Chromatographie über Sephadex 78
D. Papierelution 78

V. Sequenzbestimmung am Hüllprotein und an Peptiden

A. Edman-Abbau 79
B. Hydrazinolyse 80
C. Carboxypeptidase-Abbau 80

Zusammenfassung 81

Literaturverzeichnis 82

Einleitung

Zwischen den Eiweißstoffen und den Nucleinsäuren besteht eine enge Wechselwirkung. Die Nucleinsäuren sind die Träger der genetischen Information, die unmittelbar und nur in Eiweißstoffe übersetzt werden kann.

Die Eiweißstoffe wiederum ermöglichen die Synthese und den Abbau der Nucleinsäuren, haben funktionelle und regulatorische Aufgaben (1) bei der eigenen Biosynthese und schützen die Nucleinsäuren - neben anderen Verbindungen - vor hydrolytischen Einflüssen (2).

Alle Proteine mit bekannter Funktion weisen nicht nur eine bestimmte Aminosäuresequenz auf, sondern auch eine funktionsnotwendige definierte räumliche Anordnung der Seitenketten der Aminosäuren sowie einzelner oder mehrerer Peptidketten. Offensichtlich bestimmt nur die Sequenz der Aminosäuren die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur von Eiweißstoffen. Dabei ist zu beachten, daß eine bestimmte Funktion nicht nur von einer einzigen Primärstruktur - Aminosäuresequenz - erfüllt werden kann (3). Andererseits können zwei sehr ähnliche Proteine (4) mit vermutlich gleicher Tertiär-Struktur völlig verschiedene Aufgaben übernehmen.

Die räumliche Anordnung der kovalent gebundenen Aminosäuren eines Proteins ist keineswegs starr, wie bei allosterisch reagierenden Proteinen zu erkennen ist.
Über die Gesetzmäßigkeiten bei der Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur in Abhängigkeit von der Sequenz ist bisher noch nichts bekannt. Dazu ist die Kenntnis einer größeren Zahl von Proteinsequenzen mit der dazugehörigen Überstruktur nötig. Die bisherigen Ergebnisse lassen nur erkennen, daß es Aminosäuren mit größerem und mit kleinerem Einfluß auf die Tertiär- und Quartär-Struktur geben muß.

Die abnormalen menschlichen Hämoglobine (5) haben hierfür wertvolle Informationen geliefert. Sie zeigen Aminosäureaustausche, die das allosterische Hämoglobinmolekül sehr oft in seinen Eigenschaften so verändern, daß auf diese Weise molekulare Erkrankungen entstehen (6).

Der Vorgang der Veränderung eines Eiweißstoffes durch eine Mutation kann an einem Modellsystem durchgeführt werden, das Rückschlüsse von einem bekannten Protein auf die codierende Nucleinsäure erlaubt. Dazu eignet sich in besonderer Weise der von Hoffmann-Berling entdeckte Phage fd (7). Der fädige Coli-Phage fd hat ein Molekulargewicht von 11,4 Millionen und besteht zu 12% aus Nucleinsäure (DNS) und 88% aus Protein. Die Hauptkomponente ist das Hüllprotein. Neben diesem Strukturprotein ist neuerdings eine Reihe anderer Proteinkomponenten beschrieben worden (8), die mit weniger als 0,1% am Gesamtprotein beteiligt sind.

Für die Untersuchung der Mutationsfolgen nach dem Mutationsereignis an der Polynucleotidkette war die Sequenz der Hüllproteinuntereinheit - das Hüllprotein besteht aus identischen Untereinheiten - zu ermitteln.

Die vorliegende Sequenz dieser Untereinheit erlaubt jetzt die in der Arbeitsgruppe Braunitzer isolierten Hüllproteinmutanten (9) näher zu charakterisieren.

Der Phage fd gehört zu einer Gruppe von Escherichia-Coli-Bakteriophagen, die unabhängig voneinander isoliert wurden. Bisher sind fünf DNS-haltige, kleine, stäbchenförmige Phagen dieser Art bekannt: f 1 von Zinder (10), fd von Hoffmann-Berling (7), M 13 von Hofschneider (11), ZJ 2 von Bradley (12) und F 12 von Brenner (13). Sie haben alle das gleiche Molekulargewicht und gleiche molekulare Dimensionen. Ihre Wirtsspezifität ist auf "männliche" E. coli F^+- und Hfr-Stämme (14) beschränkt.

Diese Bakteriophagen gehören ebenso wie - unter bestimmten Bedingungen - die kleinen sphärischen RNS-haltigen Phagen

zur Gruppe der nicht lysierenden Viren. Durch diese besondere Form der Freisetzung (7) kann ein sauberes Phagenpräparat mit guter Ausbeute gewonnen werden. Während des logarithmischen Wachstums der infizierten Bakterien werden unter günstigen Bedingungen etwa 1000 Phagen pro Zelle und Zellgeneration (15) freigesetzt.

Die ersten Aminosäureanalysen des Hüllproteins legten die Vermutung nahe, daß die Untereinheit dieses Proteins aus etwa 150 Aminosäuren besteht und damit genauso groß wie die des Tabakmosaikvirus wäre.

Nachdem die Phagenpräparate über die trägerfreie Elektrophorese gereinigt werden konnten (v. Wettstein), ergab sich jedoch eine Kettenlänge von 80 bis 90 Aminosäuren aus Aminosäureanalysen und chemischen Molekulargewichtsbestimmungen.

In der analytischen Ultrazentrifuge wurde das Molekulargewicht der Untereinheit zu 10 000 (17) bestimmt. Endgruppenbestimmungen am Hüllprotein von v. Wettstein (16) ergaben Alanin als N-terminale und Serin als C-terminale Aminosäuren. Ferner waren zwei tryptische Peptide bekannt (v. Wettstein, unveröffentlichte Ergebnisse). In der vorliegenden Arbeit wird über einen Teil der Untersuchungen zur Ermittlung der Primärstruktur der Hüllproteinuntereinheit des Bakteriophagen fd berichtet.

Da die in der Proteinchemie üblicherweise angewandten enzymatischen Abbaumethoden bei der Sequenzermittlung des fd-Hüllproteins nur Teilergebnisse gebracht hatten und auf diesem Wege auf Peptidebene nie die ganze Proteinkette erfaßt werden konnte, wurde versucht die Primärstruktur mit chemischen Spaltungsmethoden aufzuklären.

Die gewählte partielle Salzsäurespaltung erlaubt überraschenderweise nicht, eine Partialformel für eine Peptidkette mit 90 Aminosäuren aufzustellen, sondern ließ auf Grund der isolierten Peptide eher auf eine halb so große

Untereinheit schließen. Dieser völlig unerwartete Befund, nach dem die Kette nur aus etwa 45 bis 50 Aminosäuren bestehen muß, wurde durch chemische Molekulargewichtsbestimmungen bestätigt. Das bestimmte Molekulargewicht von 5000 bis 6000 für die Untereinheit des Hüllproteins entspricht 49 Aminosäuren, wie sich aus den gleichzeitig durchgeführten Aminosäureanalysen berechnen ließ.

Die Peptide aus der Spaltung mit Salzsäure und eines chemisch-modifizierten Proteins mit der Protease Thermolysin ermöglichten die Aufstellung einer Partialformel der Polypeptidkette und führten zur endgültigen Ermittlung der Primärstruktur der Hüllproteinuntereinheit des Bakteriophagen fd.

Ein Vergleich der Hüllproteine von f 1, ZJ 2 und M 13 mit fd zeigt, daß der Unterschied sehr gering ist. Diese große Verwandtschaft hängt wahrscheinlich von der Art des zur Aufzucht verwendeten Bakterienstammes ab und scheint bei Verwendung von verschiedenen Wirtsstämmen verloren zu gehen (Zinder, persönliche Mitteilung). Das chemisch-modifizierte Hüllprotein von f 1 wurde mit Thermolysin gespalten und auf Grund von Analogieschlüssen zur Sequenz von fd eine Partialformel aufgestellt.

Allgemeiner Teil

I. Der Bakteriophage fd

A. Aufzucht

Die Züchtung des Ausgangsmaterials erfolgte nach dem von Hoffmann-Berling (7) angegebenen Verfahren, der auch infektiösen Phagen zur Verfügung stellte.
Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden nur E. coli K_{12} (λ^-) Hfr Cavalli-Stämme verwendet. Wie sich auch bei eigenen Experimenten gezeigt hat, hängt die Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins sehr stark von der verwendeten Bakterienart ab (Zinder, pers. Mitteilung). Durch die Anwendung der Alkoholfällung bei pH 3,9 - dem isoelektrischen Punkt des Phagen fd - konnten pro Liter Bakterienmedium bis zu 60 mg reines Phagenmaterial gewonnen werden.

B. Reinigung

Reinheitskriterium der verwendeten Phagenpräparate war die Aminosäureanalyse des Hüllproteins. Diese Möglichkeit ergab sich auf Grund der völligen Abwesenheit der Aminosäuren Histidin, Arginin und Cystein in diesem Protein (16). Weitere Kontrollmöglichkeiten bestanden plaquemorphologisch (18), mit dem Restriktionstest nach Arber (19) und auf Grund des Titerprofils nach der trägerfreien Elektrophorese (20), um den Phagen fd von den anderen Phagen zu unterscheiden.

Das aus der Aufarbeitung erhaltene Phagenmaterial genügte den Reinheitsanforderungen für eine Sequenzermittlung des Hüllproteins. Es zeigte in der Aminosäurezusammensetzung nur geringste Spuren (weniger als 0,01%) Arginin und Histidin.

Für die Molekulargewichtsbestimmungen wurde dagegen eine Nachreinigung in der trägerfreien Elektrophorese bei zwei verschiedenen pH-Werten (21) an die normale Aufarbeitung angeschlossen, um auch geringe Verunreinigungen auszuschließen.
Die Acrylamid-Elektrophorese in Phenol-Ameisensäure- oder Phenol-Essigsäure-Puffern nach Bauer (22) erlaubte zusätzlich eine einfache und schnelle Reinheitsprüfung der hergestellten Phagenpräparate.
Diese Methode und die trägerfreie Elektrophorese konnten jedoch nur zur Trennung von Proteinen mit unterschiedlicher Ladung oder Größe herangezogen werden.

II. Das Hüllprotein des Phagen fd

A. Darstellung

Die Abtrennung der Nucleinsäure und die Isolierung des Hüllproteins gelang mit drei Methoden.

1. Phenolextraktion
Es wurde ein abgewandeltes Phenolverfahren (23) angewendet, mit dem aus der mehrfach extrahierten wassergesättigten Phenolphase das Protein durch Fällung oder Dialyse gewonnen wurde. Diese Methode erbrachte ein verhältnismäßig gut lösliches Protein.

2. DNase Spaltung
Die DNase Spaltung des mit Ameisensäure denaturierten Phagen fd führte zu einem auch in verdünnten Säuren oder Laugen unlöslichen Hüllprotein.

3. Dissoziation des Phagen
Die Umsetzung des Gesamtphagen in denaturierenden Lösungsmitteln mit Bernsteinsäureanhydrid oder Maleinsäureanhydrid ergab dialysable Hüllproteinuntereinheiten.

Das Protein konnte durch Dialyse oder Chromatographie über Sephadex G 100 von der Nucleinsäure getrennt werden. Das acylierte Protein zeigte gute Lösungseigenschaften in basischen Puffern.
Da aber das chemisch unveränderte Hüllprotein sehr schlechte Löslichkeitseigenschaften zeigte, wurden nahezu alle Arbeiten zur Sequenzbestimmung der Hüllproteinuntereinheit mit dem Gesamtphagenpartikel durchgeführt. Die anwesende DNS störte auf Grund ihres geringen prozentuellen Gewichtsanteils nicht. Eine Ausnahme bildeten die Aminosäureanalysen, für die teilweise DNS-freies Hüllprotein verwendet wurde.

B. Tryptische Spaltung

Die Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins war bereits bekannt (16). Molekulargewichtsbestimmungen von Hobom (16) ließen ein aus etwa 90 Aminosäuren bestehendes Protein vermuten.
Durch tryptischen Abbau wurde versucht, eine Partialformel der Hüllproteinuntereinheit aufstellen zu können. Trypsin ist die Protease mit der größten Spezifität. Sie spaltet fast ausschließlich nach Lysin und Arginin. Es entstehen dabei aus einem Polypeptid, das n Lysine und Arginine enthält, n + 1 Peptide. Nur das C-terminale Peptid ist frei von Lysin und Arginin und daher leicht zu erkennen. Trypsin ist die einzige Protease mit dieser hohen Spezifität und wird deshalb bevorzugt bei enzymatischen Spaltungen unbekannter Proteine angewandt.
Da das Hüllprotein des Phagen fd kein Arginin enthält, sind auf Grund der 10 Lysinreste (16) 11 tryptische Peptide zu erwarten.
Gespalten wurde nach zwei Verfahren. Eine Spaltung erfolgte am trifluoracetylierten Protein in 0,5 m Ammoniak unter Bedingungen, die das durch die chemische Umsetzung teilweise denaturierte Protein wieder von den Acylgruppen befreiten.

Die trifluoracetylierten Lysinreste einer Peptidbindung würden sonst nicht von Trypsin hydrolysiert werden. Eine zweite Spaltung wurde mit einem in konz. Ammoniak denaturierten Phagen in 1 m Ammoniumbicarbonatlösung pH 9,0 - durch Verdünnen auf 1 m Ammoniak und Zugabe von Trockeneis - durchgeführt.
Unter den üblicherweise angewandten Bedingungen für eine tryptische Spaltung - Hitzedenaturierung und Spaltung in wässrigen Lösungsmitteln - wurde beim fd-Hüllprotein keine Freisetzung von Spaltprodukten gefunden.
Abb. 1 zeigt einen Dowex 1 x 2-Lauf löslicher tryptischer Peptide. In den Gipfeln T 1 bis T 4 sind die in Tabelle 1 zusammengestellten Peptide enthalten.

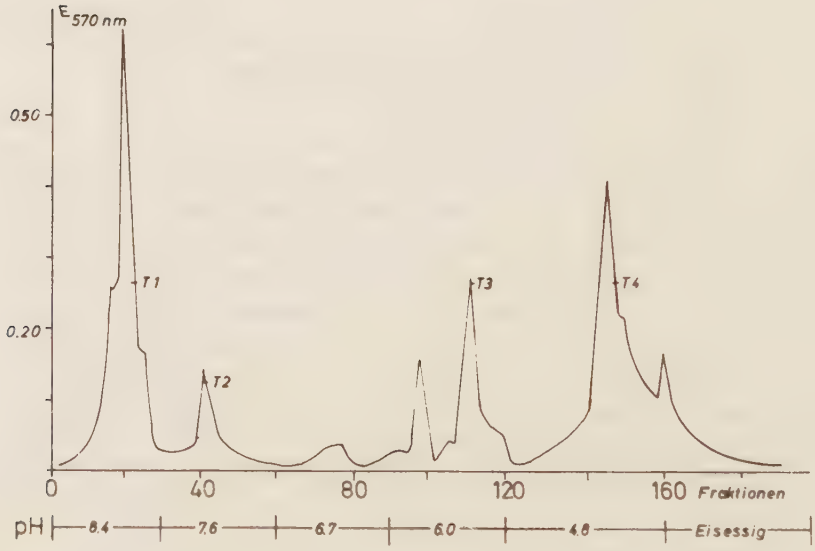


Abb. 1: Dowex-1-Lauf der löslichen tryptischen Peptide
Säulengröße: 25 x 1 cm
Ausgezogene Kurve: Ninhydrinfarbe nach alkalischer Hydrolyse

M	Try	Phe	Tyr	Leu	Ile	Met	Val	Ala	Gly	Pro	Glu	Ser	Thr	Asp	Lys	T1 A	T1 B	T 2	T 3	T 4
3		1		1											1					
4		1										1	1		1					
1															1			2		
2								1				1							3	
8								2	1	1	1			2	1					4

Tab. 1: Zusammensetzung der tryptischen Peptide aus dem Dowex-1-Lauf

Die Ausbeuten an Spaltungsprodukten waren jedoch auch bei den gewählten extremen Bedingungen immer sehr schlecht. Nur T 3 und T 4 - C-terminales und N-terminales Peptid - traten in guter Ausbeute auf.

Mit den löslichen tryptischen Peptiden wurden insgesamt nur 18 Aminosäuren erfaßt. Ein einheitliches Restpeptid (Core) mit den verbleibenden Aminosäuren konnte weder durch Chromatographie noch durch Elektrophorese identifiziert oder isoliert werden. Der tryptische Abbau eignete sich somit nicht für die Sequenzbestimmung der Peptidkette. Ähnliche Resultate wurden von F. Asbeck und H. Köhler mit der peptischen und subtilitischen Spaltung des fd-Hüllproteins erhalten. Der Unterschied dieser Abbauwege zur tryptischen Spaltung bestand jedoch darin, daß bis zu diesem Zeitpunkt etwa 30 Aminosäuren in peptischen Peptiden und etwa 25 Aminosäuren in subtilitischen Peptiden gefunden werden konnten.

Alle diese Befunde führten zu der Annahme, daß das Hüllprotein des Phagen fd auf Grund seiner schlechten Löslichkeitseigenschaften und hohen Aggregationstendenz nur teilweise unter den angewandten Bedingungen denaturierbar war.

Eine Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften sollte über das Denaturierungsverhalten des Hüllproteins näheren Aufschluß geben.

C. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Die guten Lösungseigenschaften des nativen Phagen in wässrigen Lösungsmitteln erlauben eine sehr genaue optische Konzentrationsbestimmung (7) und die Bestimmung des Helixanteils (36).
Die optischen Eigenschaften des Hüllproteins konnten erst eingehender untersucht werden, nachdem es gelang, das DNS-freie Protein durch Acylierung in eine lösliche Form überzuführen.

1. UV-Spektren

Die charakteristische Absorption von Proteinen im UV wird durch die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin bestimmt. Dabei hängen das Extinktionsmaximum und die molare Extinktion dieser chromophoren Gruppen von der Lage der Reste im Molekül ab. Absorptionsmaximum und Extinktion von Tyrosin sind zusätzlich noch pH abhängig. Eine Ionisation der phenolischen Hydroxylgruppe, deren pK bei pH 10,4 liegt, erhöht die Extinktion und verschiebt die Absorptionsbanden nach längeren Wellenlängen.
Ein Vergleich der UV-Spektren (Abb. 2) verschieden acylierter Hüllproteinderivate (s.S. 11) mit dem nativen Phagen und dem DNS-freien Hüllprotein zeigt, daß eine Substitution der Wasserstoffatome der acylierbaren Amino- und Hydroxylgruppen sich in einer Verschiebung der Absorptionsbanden nach kürzeren Wellenlängen äußert.
Dieser Effekt kann nur verstanden werden, wenn man einen Einfluß der neu eingeführten Gruppen auf die Tyrosin- und Tryptophanreste annimmt. Eine Änderung der Umgebung dieser Reste - Denaturierung oder Umfaltung - von nichtpolar nach polar kann diese Veränderung hervorrufen (33).

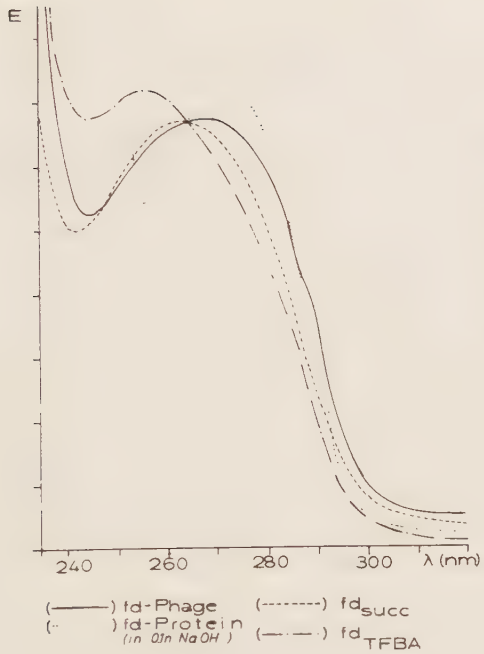


Abb. 2:
UV-Spektren von vier verschiedenen Phagen- und Hüllproteinderivaten.

fd-Protein ist in 0,1 n NaOH gelöst, die anderen Proben sind wässrige Lösungen bei pH 8,0 (Phosphatpuffer).

2. Optische Rotationsdispersion (ORD)

Die optische Rotation bei verschiedenen Wellenlängen im Spektralbereich maximaler Absorption wird als Optische Rotationsdispersion bezeichnet.

Die ORD wird als Hilfsmittel zur Bestimmung der Sekundärstruktur eines Proteins herangezogen, für das noch keine Röntgenstrukturanalyse vorliegt. Dafür wurden eine Reihe von empirischen Gleichungen (33) entwickelt, die aber für jedes Protein speziell verändert werden müssen.

Etwas übersichtlicher liegen die Verhältnisse bei vergleichenden ORD-Messungen, die sich auf die molare Drehung im Bereich des Cotton-Effekts beziehen.

Als Cotton-Effekt wird das gekoppelte Phänomen der ungleichen Absorption - Circulardichroismus - und der un-

gleichen Transmission - elliptische Polarisation - eines links und rechts zirkular polarisierten Lichts durch eine echte Lösung bezeichnet.
Der Cotton-Effekt (37) kann zur Bestimmung des prozentuellen Anteils von Aminosäuren einer Polypeptidkette, die in helikaler Form angeordnet sind, herangezogen werden. Der Phage fd und die ihm verwandten Phagen zeigen einen ausgeprägten negativen Cotton-Effekt bei 233 nm, der für eine rechtsdrehende α-Helix charakteristisch ist.
Day (36) findet mehr als 90% der Aminosäuren des Hüllproteins des nativen Phagen in einer helikalen Konformation. Eigene Untersuchungen geben Anlaß zu der Vermutung, daß dieser Wert zu hoch ist und daß mit einem Helixgehalt von etwa 75% für das native fd-Protein zu rechnen ist. Da die monomere Hüllproteinuntereinheit infolge ihrer schlechten Löslichkeitseigenschaften nicht in der ORD vermessen werden kann, wurden die einzelnen Werte mit Phagenlösungen bestimmt. Die DNS stört die Messungen nicht (36). Dabei muß jedoch ein möglicher Einfluß einer symmetrischen Überstruktur in die Meßergebnisse der ORD mit einbezogen werden, da durch die regelmäßige Anordnung der Untereinheiten auch die nicht helikalen Bereiche eine starre Konformation aufweisen.

ORD-Messungen in nichtpolaren Lösungsmitteln (38) zeigen für den fd-Phagen in 40%iger Dimethylformamid- und 40%iger Dioxanlösung bei 233 nm eine um 24% verminderte optische Rotation. Die Ursache für diese Veränderung kann sowohl in einer Veränderung der Sekundär- und Tertiär-Struktur durch Sprengung hydrophober Bindungen, die diese Strukturen stabilisieren können, als auch in einer Verringerung der Aggregationstendenz - Änderung der Quartär-Struktur - der Untereinheiten durch diese Lösungsmittel liegen (J. Engel, pers. Mitteilung). Messungen der Denaturierungskinetik des nativen Phagen in zwei Lösungsmittelgruppen (Tab. 2) - von denen die einen die hydrophoben Wechselwirkungen der Aminosäuren beeinflussen, und die anderen Wasserstoffbrücken sprengen -

Lösungsmittel	Konz. in H_2O	Meß-Bereich (Grad-Celsius)	Helix-Coil-Übergang	Rest-Cotton-Effekt (bei 233 nm) nach Denaturierung	Bezugs-Temperatur
Wasser (Phospatpuffer pH7)	100%	25-90°	95°	61%	90°
Ameisensäure	40%	25-50°	—	~10%	50°
i-Propanol	40%	25-50°	45°	13%	50°
Äthylenglykol	40%	25-93°	55°	24%	92°
Propylenglykol	40%	25-90°	80°	0%	90°
Dioxan	40%	25-90°	60°	10%	90°
Dimethyl-formamid	40%	25-75°	62°	24%	72°

Tab. 2: Hitzedenaturierung des fd Phagen in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Spalte Helix-Coil-Übergang gibt die Temperaturen an, bei den die größte relative Änderung bei 233 nm hervorgerufen wird.

zeigen einen unscharfen Helix-Coil-Übergang (Abb. 3). Dieses Verhalten ist charakteristisch für kurze Helix-Segmente (39) oder Helix-Bereiche mit verschiedener Stabilisierung. Da mit Ameisensäure, einem Lösungsmittel das die helix-stabilisierenden Wasserstoffbrücken sprengt, mehr als 10% der nativen Helixanteile (Tab. 2) nicht denaturierbar waren, mußte auf einen ausgedehnten hydrophoben Teil innerhalb der Peptidkette geschlossen werden. Dieser hydrophobe Teil ist erfahrungsgemäß enzymatisch nur sehr schwer abzubauen und für die schlechten Spaltungsausbeuten verantwortlich.

Hitzedenaturierung in Wasser bei pH 7,0 (Tab. 2) zeigte bis 95°C nur einen geringen Abfall der optischen Rotation bei 233 nm. Dieses Ergebnis bestätigt den biologischen Befund,

Abb. 3:
Denaturierungskinetik des fd-Phagen in 40%-igem Propylenglykol. Aufgetragen ist die relative Änderung des negativen Cotton-Effekts bei 233 nm gegen die Zeit für bestimmte Temperaturbereiche.

daß der native Phage fd bis zu etwa 90°C hitzestabil ist und infektiös bleibt (Hobom, persönliche Mitteilung). Nur in Gegenwart von lipophilen Lösungsmitteln wie Dioxan oder Propylenglykol (Abb. 3) gelang eine vollständige Hitzedenaturierung durch die Sprengung der hydrophoben Bindungen.

Die aus der ORD erworbenen Kenntnisse über die Denaturierungseigenschaften und die Beschaffenheit des Hüllproteins führten zu dem Versuch, das Hüllprotein mit Salzsäure zu spalten, nachdem der tryptische Abbau in 40%igem Dioxan keine neuen Spaltprodukte erbrachte und eine enzymatische Spaltung in Propylenglykol sich als undurchführbar erwies, da die Proteasen offensichtlich denaturiert wurden.

III. Salzsäurespaltung des Hüllproteins

A. Spaltung

Die Partialhydrolyse mit konzentrierter Salzsäure nach Sanger (40) stellt eine Spaltung am denaturierten Material dar. Da strukturell besonders stabile Bereiche, die enzymatisch nicht abzubauen sind, in diesem Fall mit in die Spaltung einbezogen werden, sollten mit dieser chemischen Abbaumethode alle Sequenzbereiche der Analyse zugänglich werden.
Die Spezifität der Salzsäurespaltung hängt von der Hydrolysendauer ab. Nach kurzzeitigen Spaltungen - bis zu 15 Stunden - wird eine auffallend und überraschend große Spezifität beobachtet, während bei langzeitigen Spaltungen - ab 32 Stunden - diese Eigenschaft allmählich verloren geht. Peptidbindungen, deren NH-Gruppe aus einer Hydroxyaminosäure stammt, werden zuerst angegriffen. Bei kurzen Spaltungszeiten treten Spaltprodukte auf, die in N-terminaler Position Serin-, Threonin- und Tyrosinreste aufweisen. Die Reaktivität nimmt von Serin über Threonin nach Tyrosin ab.
Die Partialhydrolyse mit 12 n Salzsäure wurde so gewählt, daß die Peptide im Durchschnitt mehr als drei Aminosäuren - Tripeptide und größer - enthalten sollten.
Bei den Voruntersuchungen stellte sich heraus, daß bei kurzzeitiger Spaltung bei 25°C nur eine kleine Anzahl relativ großer Peptide entstand. Wie bei den enzymatischen Spaltungen blieb auch hier ein undefinierbarer unlöslicher Rückstand zurück. Bei längerer Spaltungsdauer verschwand dieser unlösliche Rückstand völlig.
Die einzelnen Spaltungsergebnisse nach verschiedenen Zeiten wurden mit der "Fingerprint-Technik" verglichen. Diese Fingerprint-Methode stellt in zweidimensionaler Anordnung die Kombination einer Papierelektrophorese mit - um 90° verdreht - einer Papierchromatographie dar. Die Peptide werden mit Ninhydrin angefärbt.

Spaltungen mit konzentrierter Salzsäure bis zu 15 Stunden bei 25°C zeigten etwa 5 lösliche Spaltprodukte im Fingerprint. Spaltete man länger, so nahmen die ninhydrinpositiven Flecken angefärbter Peptide zu, bis mit der totalen Hydrolyse zu Dipeptiden und Aminosäuren ein Grenzwert erreicht wurde. Das war bei einer Spaltungsdauer von etwa 120 Stunden der Fall.
Es wurde eine Spaltungsdauer von 32 Stunden bei 25°C - Spaltung A - mit anschließender 48-stündiger Nachspaltung - Spaltung B - des unlöslichen Anteils der vorhergehenden Spaltung gewählt.

B. Trennung und Reinigung der Peptide

Die chromatographische Trennung und Reinigung von Peptiden, die bei der Spaltung einer Polypeptidkette anfallen, gelingt normalerweise nicht in einem Schritt.
Schon das Auftreten eines unlöslichen Anteils (Core) bei der partiellen Hydrolyse mit Salzsäure - der in wässrigen Puffern vom löslichen Anteil durch Zentrifugation abgetrennt wird - macht bereits eine getrennte Behandlung zweier Fraktionen erforderlich.
Bei der 32-stündigen Salzsäurespaltung wurde der lösliche vom unlöslichen Anteil durch Elution bei pH 2,2 und pH 9,5 und anschließendes Abzentrifugieren des unlöslichen, ausgefällten Sediments getrennt. Der unlösliche Teil, der sich aus "Corepeptiden" und unvollständig gespaltenem Hüllprotein zusammensetzt, wurde 48 Stunden mit Salzsäure nachgespalten und anschließend auf die gleiche Weise in den löslichen und unlöslichen Anteil aufgetrennt.
Der lösliche Anteil der beiden Spaltungen A und B wurde durch Säulenchromatographie über Dowex 1 x 2 mit modifizierten Gradienten nach Braunitzer und Rudloff (41) vorgetrennt (Abb. 4). Die Core-Fraktionen konnten durch Gelfiltration über Sephadex G 50 (Abb. 7) gereinigt werden.

1. Chromatographische Trennung über Dowex 1 x 2
Durch die Einführung flüchtiger Puffer für die Säulenchromatographie mit dem Anionenaustauscher Dowex 1 (41) wurde eine Vortrennung basischer, neutraler und saurer Peptide möglich, die eine anschließende Rechromatographie einzelner Gipfel über Kationenaustauscher wesentlich wirkungsvoller machte. Die Gipfelfraktionen wurden dazu im Rotationsverdampfer einrotiert und konnten ohne störende Salzionen nachgetrennt werden.
Abb. 5a und Abb. 5b zeigen die Übersichtschromatogramme der Dowex-1-Läufe A (Abb. 4 A) und B (Abb. 4 B). Diese Übersichtschromatogramme sind für die Beurteilung der Reinheit der Peptide aus den einzelnen Gipfeln des Chromatographielaufes eine wertvolle Hilfe. Sie zeigen einerseits, wieviel Peptide in jedem Gipfel vorhanden sind und nach einer Rechromatographie wieder auftreten müssen. Andererseits ist es möglich gewesen, auf diese Weise bereits zu erkennen, welche der Peptide der Spaltungen A und B gleich sind. Es zeigte sich, daß bei der Nachspaltung im löslichen Anteil keine neuen Peptide auftraten. Dieser Befund war völlig unerwartet. Auch die Salzsäurespaltung schien nur Peptide aus den Bereichen freizusetzen, die bereits mit den Proteasen Pepsin und Subtilisin erfaßt worden waren.
Im folgenden Teil wird über die Reinigung der Peptide aus den Gipfeln I bis X der Dowex-1-Chromatographie A berichtet werden, da wie bereits erwähnt, aus Lauf B keine neuen Peptide zu erwarten waren.

2. Lösliche Peptide aus der Salzsäurespaltung
Ein einziger Gipfel des Dowex-1-Laufes A enthielt ein sauberes Peptid. Es war das N-terminale stark saure Pentapeptid Asp_2, Glu, Gly, Ala aus Gipfel X. Alle anderen Gipfel bestanden aus mehreren Peptiden, die über Dowex 50 x 2 (D50) oder Phosphorcellulose (PC) rechromatographiert wurden (Abb. 6 A bis I). Einige Gipfel aus den

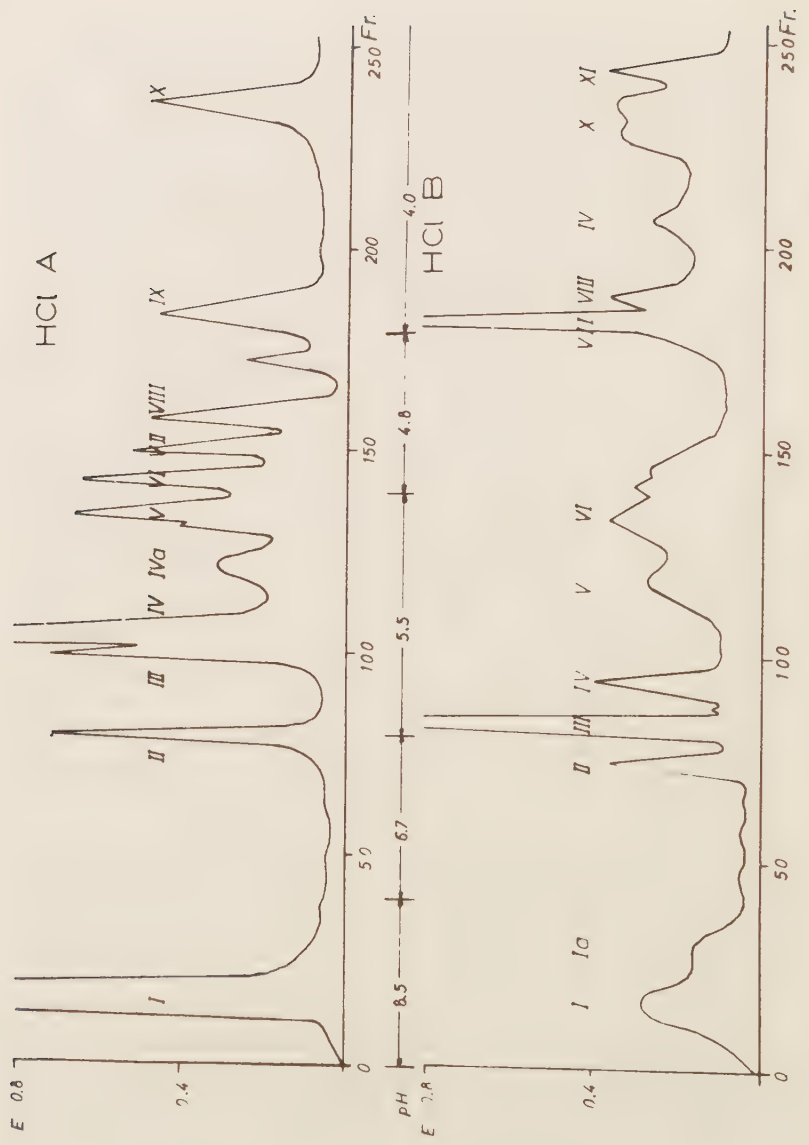


Abb. 4 A und B: Säulenchromatographische Auftrennung der HCl-Peptide (löslicher Anteil) von Spaltung A und B über Dowex 1 x 2.
Ausgezogene Linie: Ninhydrinfarbe nach alkalischer Hydrolyse (s. exp. Teil)

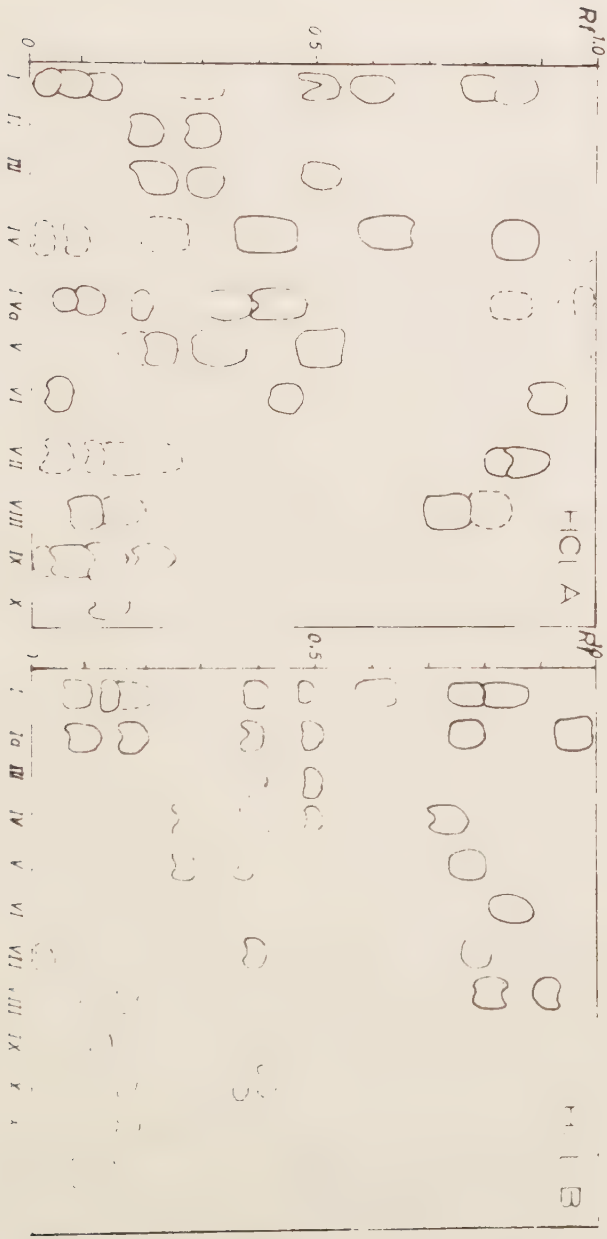


Abb. 5 a und b: Übersichtschromatogramme der HCl-Läufe A und B. Gegeben sind alle ninhydrinpositiven Flecken.

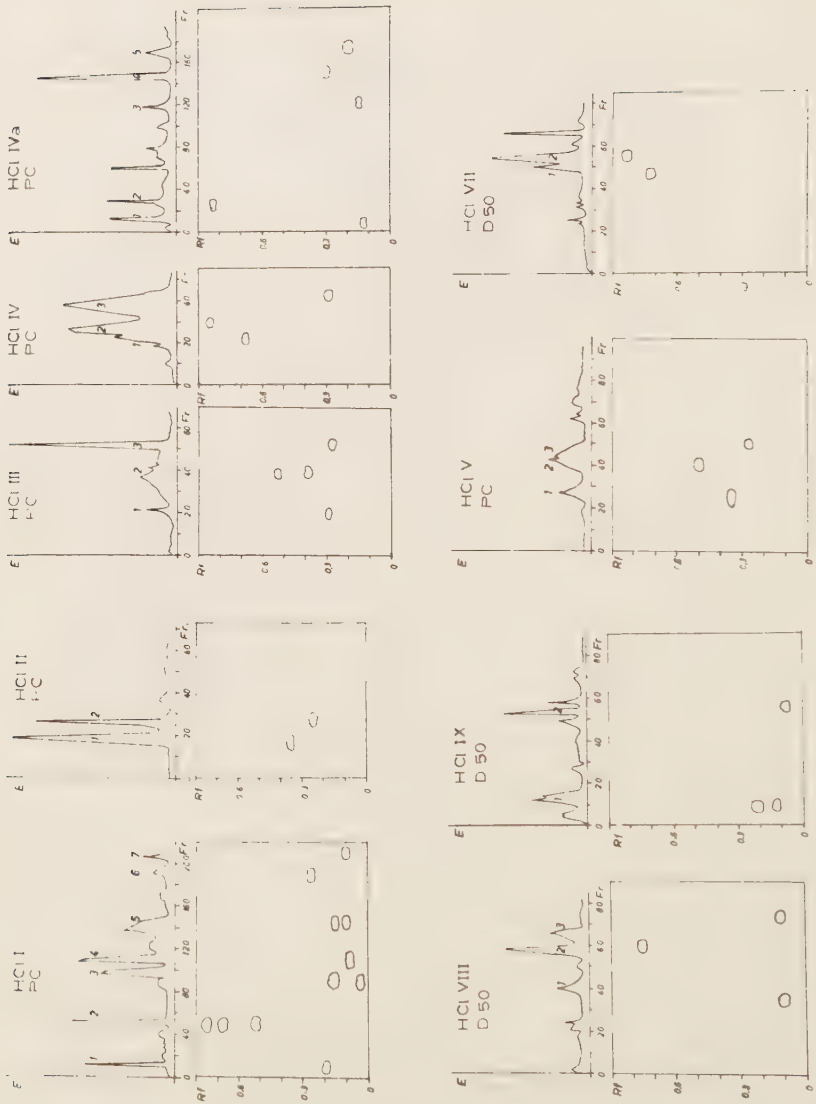


Abb. 6 A bis I: Rechromatographien der Gipfel I bis V und VII bis IX des HCl A-Laufes.
PC bedeutet Rechromatographie über Phosphor-Cellulose
D50 bedeutet Rechromatographie über Dowex 50 x 2

Abb. 6 a bis i: Übersichtschromatogramme zu den Rechromatographien des HCl-A-Laufes. Gezeigt sind alle ninhydrinpositiven Flecken.

Rechromatographie-Läufen zeigten nach diesem zweiten Trennschritt im Übersichtschromatogramm (Abb. 6 a bis i) mehrere Peptide. Diese Peptidgemische konnten alle durch Papierelution (P) endgültig getrennt werden. Diese Elutionsmethode nützt die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit - Rf-Wert - von Peptiden mit ungleicher Aminosäurezusammensetzung auf Zellulosepapier (Whatman Nr. 3) in geeigneten Lösungsmittelsystemen (s. exp. Teil) aus. Der Rf-Wert, eine charakteristische Konstante für Peptide und Aminosäuren, ist die Verhältniszahl aus zurückgelegter Wanderungsweite des Lösungsmittels - oder auch von Leucin als Bezugswert - zu der des Peptids - oder Aminosäure - und ändert sich mit den Chromatographiebedingungen. Der Rf-Wert ist kleiner oder gleich 1.
Die durch Rechromatographien und Papierelutionen gereinigten Peptide wurden nach Totalhydrolyse mit 6 n HCl mit einem automatischen Aminosäureanalysator in ihrer Bruttozusammensetzung bestimmt. Die Aminosäure-Zusammensetzung sämtlicher Peptide aus dem Dowex-1-Lauf A ist in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Peptide sind durch die römische Nummer des Gipfels - I bis X - des Dowex-1-Laufes A und Angaben über Art der Rechromatographie - D50 oder PC - mit lateinischer Numerierung der Gipfel - 1 bis n - gekennzeichnet. Ein Hinweis auf durchgeführte Papierelution - P - erfolgt abschließend. Das Peptid mit dem niedrigsten Rf-Wert ist mit der lateinischen Zahl 1 beziffert.
Die aufgeführten Verhältniszahlen sind aus den Mikromolmengen ermittelt, die sich für jede Aminosäure aus der Analyse berechnen lassen. Das Verhältnis der Aminosäuren, das von ganzen Zahlen nur wenig abweichen soll, folgt aus der Division eines "Gemeinschaftlichen Vielfachen" durch die einzelnen Mikromolmengen. Abweichungen sind erfahrungsgemäß bei den Aminosäuren Lysin und Prolin durch den Aminosäureanalysator bedingt. Prolin bildet mit dem Ninhydrinreagenz als Iminosäure keinen blauen Farbstoff und die Messung des gelben Farbstoffes aus Prolin und Ninhydrin bei

Peptid	I-PC											II-PC		III-PC				IV-PC			IVa-PC					V-PC			VI-P			VII-D50		VIII-D 50			IX-D50		X
	1	2 P1	2 P2	2 P3	3 P1	3 P2	4	5 P1	5 P2	6	7	1	2	1	2 P1	2 P2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3	1	2	
Lys		0.82	0.95	1.13	1.07	1.09	0.99	1.09	1.12	2.19	2.06						1.03						0.84	3.13	3.19			1.04	1.03					0.91		1.17		1.04	
Asp																	1.02				0.91	1.12						1.16	1.86			1.11	1.01	2.23		2.83	1.97	2.96	1.94
Thr			0.94	0.92	1.00		1.00					1.00							0.96					0.95							0.98				1.18				
Ser	0.99				1.88		1.01	1.07	0.88				1.00	1.03	1.02			1.03		0.89								1.01			1.06								
Glu																		0.94			1.02					1.09	1.02	1.02	1.08	1.02	1.00			0.85		1.10	1.04		
Pro						1.13											1.04											0.91	1.31					0.69		0.84		0.82	
Gly			1.15	0.97															1.04		1.04			0.96		0.93			1.03						0.97		0.99	1.13	0.95
Ala	1.01	2.21			1.05	1.78	1.01	0.84	1.01					0.97	1.98	1.00	2.98	0.97		1.09	0.94	1.07	2.02			0.97	0.97	3.96	2.99		0.94	1.91	0.72	1.86		3.04	0.93	3.99	
Val																																							
Met																																							
Ile			1.94	1.90															0.99					2.07	0.99										0.98				
Leu			1.16	1.07														1.06						1.05	0.97			0.92			0.99								
Tyr																																			0.60				
Phe				0.83						1.81	0.95						0.97					1.02	1.01	1.96	2.04			0.96				1.01	0.98			0.96		0.98	
Try																																							
Σ	2	3	6	7	5	4	4	3	3	4	3	1	1	2	3	1	7	4	3	2	3	3	5	10	7	3	2	11	9	2	4	4	3	6	5	9	5	.	.

Tab. 3: Analysenergebnisse der Peptide aus dem HCl-Lauf A (lösliche Peptide).
Die Werte für Thr und Ser wurden mit empirischen Faktoren korrigiert.

440 nm ist mit größeren Fehlern behaftet. Lysin wird zusammen mit den Aminosäuren Tryptophan, Histidin und Arginin auf der 7 cm Säule des Analysators bestimmt und erfahrungsgemäß oft zu groß.
Die für die Peptide I, PC-3, P-2 und I, PC-5, P-1 gefundenen Alaninwerte liegen außerhalb der Fehlergrenze. Es handelt sich hier um verunreinigte Peptide mit C-terminalem Alanin. Da Alanin in der Verunreinigung fehlt, erscheint der Alaninwert zu niedrig.
Der schlechte Alaninwert von VII, D50-2 - das Peptid stammt aus dem gleichen Bereich wie I, PC-3, P-2 - ist genauso zu begründen, nur steht hier der Alaninrest N-terminal.
Im Peptid VIII, D50-2 weichen der Tyrosinwert erheblich und der Glutaminsäurewert gering ab. Tyrosin wird bei der partiellen Salzsäurehydrolyse zersetzt, wie auch aus den Aminosäureanalysen der Core-Peptide zu erkennen ist.

Eine Zersetzung von Threonin und Serin, die bei Totalhydrolyse mit 6 n HCl bei 110°C bekannt ist, wurde bei den Salzsäurespaltungen A und B nicht beobachtet.
Insgesamt konnten 38 Aminosäuren in Peptiden aus dieser Fraktion mit den löslichen Anteilen der Salzsäurespaltung isoliert werden. Das Hauptaugenmerk wurde deshalb auf die Core-Peptide geworfen, die die restlichen Aminosäuren enthalten sollten.

3. Core-Peptide aus der Salzsäurespaltung
Ein Teil der löslichen Peptide stammte aus Bereichen der Peptidkette, die auch mit den Proteasen Pepsin und Subtilisin erfaßt worden waren. Der ganze Sequenzbereich wurde mit enzymatischen Methoden jedoch nicht erfaßt. Ein verbleibender unlöslicher Rückstand erwies sich - ebenso wie bei der tryptischen Spaltung - als uneinheitlich und ergab keine eindeutigen Aminosäureanalysen. Peptide mit Valin, einem Hauptbestandteil des unlöslichen Spaltungsrückstandes, konnten bisher nicht rein isoliert werden.

Erst mit der Salzsäurespaltung wurden Valin-Peptide und erstmalig definierte einheitliche Core-Peptide aus einem bisher unbekannten Bereich isoliert.
Der unlösliche Rückstand der HCl-Spaltungen A und B konnte in organischen Säuren gelöst werden. Als Lösungsmittel eignete sich ein Gemisch aus 40% Ameisensäure, 20% Essigsäure und 40% Wasser, das auch für die säulenchromatographische Trennung der Core-Peptide über Sephadex G 50 (Abb. 7) verwendet wurde. Die Gelfiltration der Core-Peptide von Spaltung A trennte das Gemisch in die zwei Peptide C I und C II auf. Beide Peptide (Tab. 4) enthalten viel weniger Aminosäuren als erwartet wurde. Da sämtliche löslichen Peptide aus der Salzsäurespaltung bereits vermessen worden waren und auch bei der 48-stündigen Nachspaltung keine neuen löslichen Peptide auftraten, sollten im unlöslichen Anteil etwa 50 Aminosäuren vertreten sein. Das isolierte Hauptcore C II enthält aber nur 11 Aminosäuren. Der unlösliche Rückstand von Spaltung B bestand zudem hauptsächlich aus einem einzigen Peptid, das identisch mit C II ist.

Diese Befunde auf Peptidebene sprachen für das Vorliegen einer wesentlich kleineren Polypeptidkette, als ursprünglich vermutet wurde. Aus den Peptiden der Salzsäurespaltung ließ sich eine nur etwa halb so große Kette zusammensetzen wie erwartet wurde. Es galt diesen Befund mit Molekulargewichtsbestimmungen der Untereinheit zu bestätigen.

Ein weiteres Core-Peptid C III konnte nach 24-stündiger partieller Hydrolyse mit konz. HCl bei 60°C aus dem unlöslichen Anteil ebenfalls durch Gelfiltration über Sephadex G 50 gereinigt werden. Es wurde vor der unteren Ausschlußgrenze eluiert, die für Sephadex G 50 mit einem Molekulargewicht von 5 000 beginnt. Peptid C III ist bereits in 10%-iger Pyridinlösung löslich.
Die Ergebnisse der Aminosäureanalysen der Core-Peptide C I bis C III sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die langen Hydrolysezeiten bis zum Erreichen des Grenzwertes 4 für Valin deuten auf Val-Val und Val-Ile Bindungen (s. Amino-

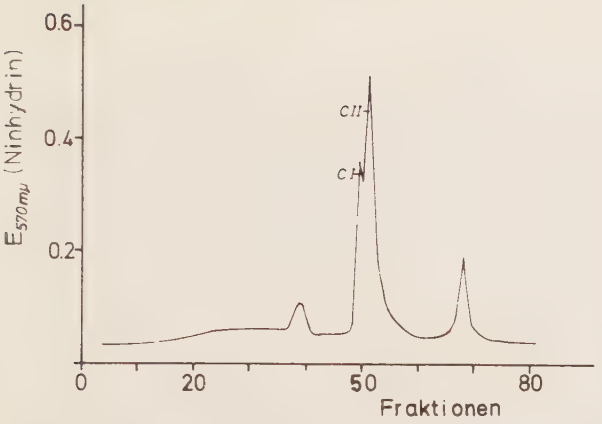


Abb. 7:
Chromatographie des unlöslichen Anteils von Spaltung A über Sephadex G 50.
Elution mit 40% Ameisensäure, 20% Essigsäure, 40% Wasser
Säule: 150 x 2 cm
2 ml pro Fraktion
3 Fraktionen pro Stunde.

	C I			C II			C III		
Hydrolyse (h)	20	40	Σ	20	40	200	Σ	20	100	Σ
Lys										
Asp										
Thr	0.70	0.76	1							
Ser										
Glu	0.89	0.81	1							
Pro										
Gly	2.02	2.01	2	1.11	1.11	1.00	1			
Ala	3.32	3.18	3	1.97	2.03	2.08	2			
Val	4.10	3.18	4	1.56	2.83	3.40	4	3.01	3.95	4
Met	0.90	0.83	1	0.54	0.75	0.76	1	0.37	0.28	1
Ile	2.01	1.76	2	0.94	1.07	1.00	1	0.99	1.12	1
Leu										
Tyr	1.24	+	2	0.98	0.76	+	1			
Phe										
Try	+	+	1	+	+	+	1			
Σ			17				11			6

\+ nach Performeisensäure Oxydation
(Met als Met-SO_2)

Tab. 4:
Aminosäurezusammensetzung der Core-Peptide C I - C III. Die Werte für Thr und Ser sind mit empirischen Faktoren korrigiert.

Try-Nachweis erfolgte am unhydrolysierten Peptid mit Ehrlich-Reagenz.

säureanalysen). Tryptophan konnte in den Peptiden C I und C II mit dem Ehrlich-Reagenz (42) nachgewiesen werden. Diese Farbreaktion liefert einen eindeutigen qualitativen Nachweis für Tryptophan, das als säurelabile Aminosäure bei der Totalhydrolyse mit 6 n HCl völlig zerstört wird und im Aminosäureanalysator nicht nachgewiesen werden kann. Einer enzymatischen Totalhydrolyse (29) war das "unlösliche" Peptid C II nicht zugänglich.
Die schlechten Analysenwerte für die säurelabilen Aminosäuren Tyrosin und Methionin sind eine Folge von Zersetzungsreaktionen während der Salzsäurespaltung und der Chromatographie in dem stark sauren Lösungsmittelgemisch aus Ameisensäure und Essigsäure.

IV. Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheit

Die hohe Aggregationstendenz des untersuchten Proteins verhinderte lange Zeit eine genaue Molekulargewichtsbestimmung der Untereinheit. Da die mit physikalischen und chemischen Methoden (16, 17) erzielten Ergebnisse mit den Resultaten auf Peptidebene nicht in Einklang zu bringen waren, wurde die modifizierte Hydrazinolysemethode von Braun und Schroeder (24) als eine neuere chemische Molekulargewichtsbestimmung verwendet.
Bei der Hydrazinolyse wird das Protein mit wasserfreiem Hydrazin hydrolysiert; dabei entstehen aus allen Aminosäuren - mit Ausnahme der C-terminalen - die Hydrazide, die säulenchromatographisch abgetrennt werden können.
Die freie C-terminale Aminosäure wird anschließend auf dem Aminosäureanalysator quantitativ bestimmt.
Der nucleophile Angriff des Hydrazins auf die Peptidbindung wird in Gegenwart von Wasserstoff-Ionen erleichtert.
Da die Umamidierung der Peptidbindung mit Hydrazin unter Ausschluß von Wasser erfolgen muß, das mit Hydrazin ein Salz bildet und selbst stark nucleophil ist, wird als Protonenlieferant ein Harz mit Carboxylgruppen in der H^+-Form - IRC 50, H^+-Form - verwendet.

Durch den Vergleich der Ergebnisse aus 9 Hydrazinolysen (Tabelle 5) und mehreren Aminosäureanalysen aliquoter Proteinteile ergab sich das unkorrigierte extrapolierte Molekulargewicht von 5900 für die Untereinheit (Abb. 8). Das ist etwa die Hälfte des in der analytischen Ultrazentrifuge bestimmten Wertes (17).

t (Stunden)	5	10	15	20	30	42	72	96	144
mμ Mol Serin	220	242	308	286	264	263	231	143	089

Tab. 5: Hydrazinolysenergebnisse von 2 mg Protein nach verschiedenen Zeiten t (Stunden). Die Serinwerte sind unkorrigiert.

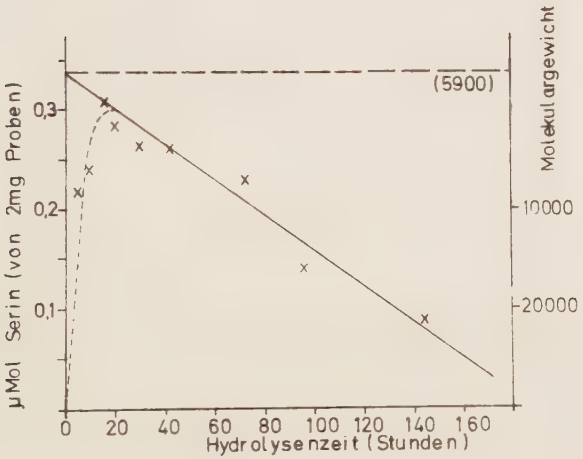


Abb. 8: Hydrazinolyse des fd Hüllproteins
Die Serinwerte aus den einzelnen Hydrazinolysen sind gegen die Zeit aufgetragen. Durch Extrapolation für t = 0 wurde ein Molekulargewicht von 5900 graphisch ermittelt.

Serin wird aber bei einer 40-stündigen Hydrazinolyse zu 39% zerstört (24). Dieser Wert wurde aus einer Hydrazinolyse der freien Aminosäure Serin im Gemisch mit Lysozym bestimmt. Bei Berücksichtigung der Zersetzung des Serinrestes während der Hydrazinolyse des fd-Hüllproteins ergibt sich ein korrigierter Wert von 0,431 µMol für Serin bei 2 mg Einwaage. Das entspräche einem Molekulargewicht von etwa 4700, wenn die Korrekturfaktoren auch für dieses Protein Gültigkeit besitzen. Im allgemeinen müssen jedoch für jedes Protein spezielle Korrekturfaktoren ermittelt werden, da die Aminosäurezusammensetzung eines Proteins bei den Zersetzungsreaktionen eine nicht unerhebliche Rolle spielt.

Aus den Hydrazinolysen ergibt sich eindeutig, daß die Untereinheit des fd-Hüllproteins nur halb so groß sein kann, wie ursprünglich angenommen wurde. Dieses Ergebnis konnte nur mit dieser wesentlich effektiveren neueren Hydrazinolysemethode von Braun und Schroeder erreicht werden, da vorher mit der gleichen Grundmethode andere Ergebnisse erzielt wurden (16).

Damit konnten die Ergebnisse, die auf Peptidebene mit den Peptiden der Salzsäurespaltung erhalten worden waren, bestätigt werden.

Die neue Lage erforderte auch eine Neuberechnung der Aminosäureanalysen des Hüllproteins. Da sich nicht alle Aminosäure-Werte der bisherigen Bruttoformel halbieren ließen - insbesondere nicht die Valin -, Isoleucin- und Glycinwerte - , wurden neue Aminosäureanalysen des Gesamtproteins durchgeführt.

V. Die Bruttoformel des fd-Hüllproteins

Nachdem die Größe der Untereinheit durch die Hydrazinolyse bestimmt worden war, gelang zum ersten Mal die Aufstellung einer genauen Bruttoformel des Hüllproteins. Das überraschend kleine Molekulargewicht ermöglichte bereits ohne Kenntnis der

Primärstruktur die Berechnung der endgültigen Bruttoformel aus der Aminosäureanalyse[+)]. Die Aminosäurezusammensetzung sollte auch Aufschluß darüber geben, ob mit der Salzsäurespaltung alle Bereiche und damit alle Aminosäuren erfaßt worden waren. DNS-freies Hüllprotein zeigte in der quantitativen Analyse niedrigere Glycin-Werte als der Gesamtphage nach der Totalhydrolyse mit 6 n HCl. Unter den Hydrolysebedingungen wurde durch hydrolytische Zersetzung der Purinbasen der DNS offensichtlich Glycin freigesetzt. Über eine solche Erscheinung wurde bereits mehrfach berichtet (27).

Durch Hydrolyse von Lachsspermien-DNS, die 29,7% Adenin und 20,8% Guanin enthält, wurde eine Eichkurve (Abb. 9) für die Glycinfreisetzung aus 1 mg fd-Phage in Abhängigkeit von den Hydrolysezeiten aufgestellt. Die Werte aus der Hydrolyse der Lachsspermien-DNS wurden umgerechnet auf den Purinbasengehalt der fd-DNS (Adenin 24,5%, Guanin 20,0%). Dabei entsprechen 1 mg Lachsspermien-DNS einer Einwaage von 9,5 mg fd-Phage (1,14 mg fd-DNS).

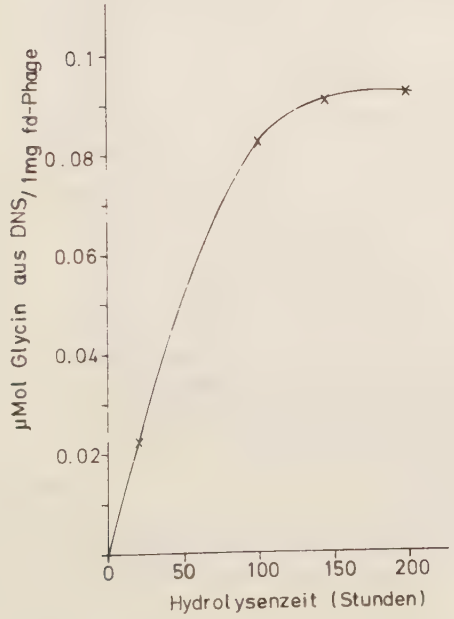


Abb. 9:
Glycin-Eichkurve für 1 mg fd-Phage (0,12 mg fd-DNS). Die für die jeweiligen Hydrolysezeiten extrapolierten Glycin-Werte (in µMol) sind von der Gesamtanalyse abzuziehen.

+) Bei großen Proteinen ist das nicht ohne weiteres möglich (s. exp. Teil)

Eine vollständige Hydrolyse des Hüllproteins gelang bei DNS-freiem Material erst nach 400-stündiger Reaktion, während der leichter lösliche Gesamtphage schon nach 200 Stunden nahezu völlig hydrolysiert war (Tab. 6). Bei den sehr langen Hydrolysezeiten, die für die Totalhydrolyse eines Proteins bisher in diesem Ausmaß noch nicht angewendet werden mußten, wurde eine Umwandlung von Isoleucin in Alloisoleucin beobachtet. Bereits nach 40 Stunden bildeten sich 2% Alloisoleucin. Die quantitative Beziehung der Alloisoleucinbildung aus Isoleucin (Racemisierung) wurde untersucht und eine Kurve für die Korrektur der Isoleucinwerte (Abb. 10) ermittelt. Die Umwandlungsreaktion war konzentrationsunabhängig und scheint somit eine Reaktion 1. Ordnung zu sein.

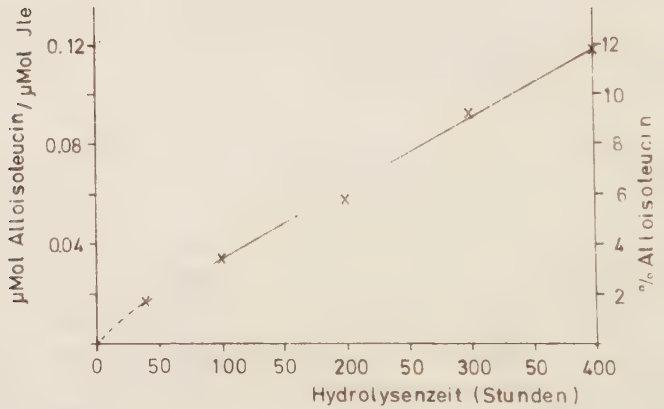


Abb. 10: Entstehung von Alloisoleucin aus Isoleucin
Der prozentuelle Alloisoleucingehalt wurde auf die Einwaage an Isoleucin bezogen.

Alloisoleucin konnte auf dem Aminosäureanalysator quantitativ bestimmt werden, da es auf der langen Säule vor dem Isoleucingipfel eluiert wird.

Probe	fd Phage	fd Phage	fd Phage	fd Protein[1]	fd Protein[2]	fd Protein[2]	
Hydrolyse (h) / Aminosäure	20	100	200	20	200	400	
Lysin	4.97	—	5.17	4.83	—	—	5
Asparagin-säure	3.02	2.92	3.07	3.12	3.03	3.12	3
Threonin	2.91	—	—	2.91	—	—	3
Serin	4.24	—	—	3.88	—	—	4
Glutamin-säure	3.10	3.04	2.95	3.08	3.00	2.51	3
Prolin	1.07	1.07	1.09	1.23	1.22	1.10	1
Glycin*	4.15	4.01	4.33	3.68	3.75	3.98	4
Alanin	8.62	9.07	9.14	8.28	8.70	8.72	9
Valin	3.08	3.62	3.78	2.77	3.54	3.92	4
Methionin	0.85	0.78	0.98	—	0.90	0.83	1
Isoleucin**	3.63	3.63	3.95	3.45	3.91	3.78	4
Leucin	2.14	1.95	2.13	2.23	2.22	2.17	2
Tyrosin	1.84	—	—	1.63	—	—	2
Phenyl-alanin	2.97	2.82	2.92	2.69	2.77	2.83	3
Tryptophan[3]	+	—	—	+	—	—	1
						Summe	49

* Glycin-Werte von DNS-haltigen Proben sind nach Abb.2 korrigiert

** Isoleucin + Alloisoleucin

1 nach der Phenolmethode

2 nach DNase

3 optisch bestimmt

Tab. 6: Aminosäureanalysen des fd-Hüllproteins (Analysen mit dem Spinco Modell der Fa. Beckman) Die Werte für Thr und Ser der 20-stündigen Hydrolyse sind mit empirischen Faktoren korrigiert. Gly und Ile wurden nach Abb. 9 und 10 korrigiert. Try wurde optisch bestimmt (s. exp. Teil).

Der Tryptophangehalt konnte auf Grund des Tyr/Try Verhältnisses nach der Methode von Beaven und Holiday (28) berech-

net werden. Diese optische Bestimmungsmethode ergab ein Tyrosin-Tryptophan-Verhältnis von 2 zu 1.
Das gleiche Ergebnis wurde durch Vergleich der UV-Spektren einer Eichlösung aus Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin im Verhältnis 1 : 2 : 3 mit dem enzymatisch hydrolysierten Hüllprotein (enzymatische Totalhydrolyse nach Hill (29) erzielt. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls auf Peptidebene bestätigt. Bei allen angewandten Spaltungen wurde nur ein einziges Tryptophanpeptid gefunden.
Auffallend ist der sehr hohe Gehalt an hydrophoben Aminosäuren (Tab. 6) und die lange Hydrolysezeit zur Bestimmung der Gesamtwerte für Valin und Isoleucin.
Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Valin und Isoleucin sind auf Grund sterischer Hinderung durch ihre Seitenketten gegenüber einem hydrolytischen Angriff sehr stabil (30) und erfordern sehr lange Hydrolysezeiten. Die aus den Aminosäureanalysen des Gesamtproteins aufgestellte Bruttoformel zeigt, daß die Untereinheit des fd-Hüllproteins aus 49 Aminosäuren bestehen muß. Die gleiche Anzahl von Aminosäuren ergibt sich aus der Partialformel, die mit den Peptiden der Salzsäurespaltung aufgestellt werden konnte. Daraus folgt, daß mit der Salzsäurespaltung Bruchstücke aus allen Bereichen der Peptidkette erhalten und weder eine Aminosäure zuviel noch eine zu wenig gefunden wurden.

VI. Chemische Umsetzungen am Hüllprotein

Die Konstitutionsermittlung der Hüllproteinuntereinheit erwies sich lange Zeit als äußerst schwierig. Die Unlöslichkeit und Aggregationsneigung machten dieses Protein nahezu unzugänglich für enzymatische Abbaumethoden. Nur von den Enden erfolgte ein Angriff proteolytischer Enzyme. Die besten Ergebnisse wurden mit Pepsin von F. Asbeck und H.Köhler erzielt.
Dieses Verhalten wurde auf die hohe Konformationsstabilität des Hüllproteins zurückgeführt, die sich auf Grund des ausgedehnten hydrophoben Bereichs ausbilden kann. Angeregt durch

die Untersuchungen in der Optischen Rotationsdispersion, die unvollständige enzymatische Spaltung und die Erfolge der Salzsäurespaltung wurde versucht, durch chemische Veränderung des Hüllproteins bessere Lösungseigenschaften und ein enzymatisch spaltbares Proteinderivat zu erlangen. Solche Derivate sollten leicht denaturierbar und in denaturiertem Zustand in wässrigen Lösungsmitteln löslich sein.

Dieses Ziel wurde durch Acylierung der freien Aminogruppen und eines Teils der Hydroxylgruppen der Aminosäuren erreicht.

1. Umsetzung mit Trifluoressigsäurethioäthylester
Mit Trifluoressigsäurethioestern (31) können freie Aminogruppen sehr leicht acyliert werden, wobei das Derivat und ein meist flüchtiger Thioalkohol entstehen:

$$F_3C\text{-}C(=O)\text{-}S\text{-}R + H_2N\text{-Protein} \underset{\text{pH 10,5}}{\overset{\text{pH 9,0}}{\rightleftharpoons}} F_3C\text{-}C(=O)\text{-}NH\text{-Protein} + R\text{-SH}$$

Die Bildung einer solchen "Peptidbindung" ist durch den "Elektronensog" der Trifluormethyl-Gruppe reversibel. Die Rückreaktion ist pH-abhängig und beginnt bereits bei pH 9,5. Das trifluoracetylierte Hüllprotein zeigte bessere Lösungseigenschaften als das unmodifizierte Protein und konnte partiell mit Subtilisin und, wie bereits erwähnt, mit Trypsin abgebaut werden. Dem tryptischen Abbau war das trifluoracetylierte Präparat erst nach Abspaltung der Trifluoressigsäure-Gruppe zugänglich, da dieses Protein kein Arginin enthält. Trypsin spaltet nicht nach Lysinresten, deren ε-Aminogruppe acyliert ist.

2. Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid
Bei der von Habeeb und Cassidy (32) beschriebenen Acylierungsmethode mit Bernsteinsäureanhydrid werden außer den freien Aminogruppen - der N-terminalen Aminosäure und der ε-Aminogruppen der Lysine - auch teilweise die Hydroxyl-

gruppen von Serin- und Threoninresten (26) verestert. Eine Abspaltung dieser Succinyl-Gruppen gelingt erst unter den Bedingungen der Totalhydrolyse mit 6 n Salzsäure. Das succinylierte Phagenprotein (fd_{succ}) ist völlig denaturiert und zeigt keinerlei Cottoneffekt+) bei 233 nm in der Optischen Rotationsdispersion (Abb. 11). Das succinylierte Hüllprotein ist dialysabel - ein Hinweis auf eine stark verminderte Aggregationstendenz - und ist sehr leicht von der hochmolekularen DNS abzutrennen. Es zeigt ausgezeichnete Lösungseigenschaften, fällt jedoch unterhalb von pH 3,0 aus. Die neutrale Protease Thermolysin (34) spaltet das mit Bernsteinsäureanhydrid umgesetzte Strukturprotein völlig.

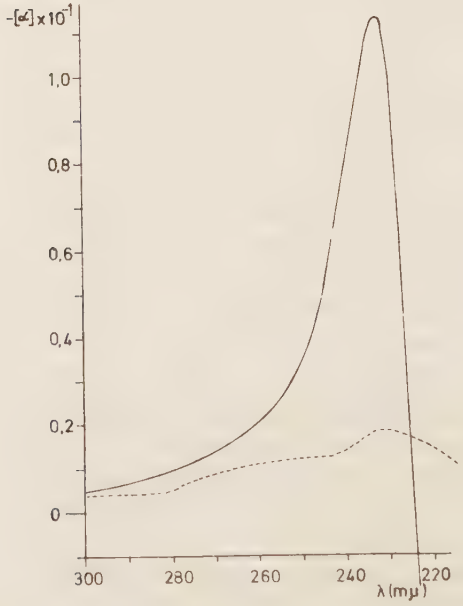


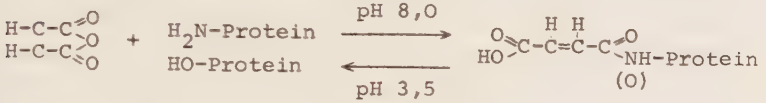
Abb. 11:
ORD des nativen Phagen fd (———) und succinylierten Phagen fd (----).
Es wurde jeweils eine Lösung von 0,04 mg/ml mit einer 1 cm Zelle auf einem Cary 60 vermessen. Der Cotton-effekt bei 233 nm ist negativ, entsprechend einer rechtsdrehenden α-Helix.

+) Auf Grund des Cottoneffekts kann nach Doty (33) eine Aussage über den Helixanteil einer Polypeptidkette gemacht werden.

3. Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid

Die Acylierungsreaktionen mit Maleinsäureanhydrid (35) und Bernsteinsäureanhydrid verlaufen gleich.

Die Maleinyl-Gruppe ist aber im Gegensatz zur Succinyl-Gruppe bei pH 3,5 wieder abspaltbar:



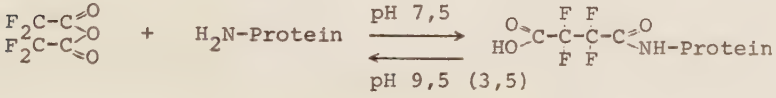
Das maleinierte Protein ist ebenfalls völlig denaturiert und zeigt das gleiche Verhalten in der ORD wie fd_{succ} bei 233 nm (Abb. 11).

Thermolysin spaltet das maleinierte Protein gleichfalls völlig.

4. Umsetzung mit Tetrafluorbernsteinsäureanhydrid (TFBA)+)

Im Tetrafluorbernsteinsäureanhydrid liegt eine neue Verbindung zur chemischen Modifizierung von Proteinen vor. Die bisher bekannten Reagentien, mit denen polare Modifikationen von Proteinen durchgeführt werden können, sind zum Teil nicht wieder unter schonenden Bedingungen abspaltbar oder besitzen nicht die gleichen löslichkeitsvermittelnden Eigenschaften dieser perfluorierten Dicarbonsäure. TFBA ist ein Reagenz, das die leichte Abspaltbarkeit der Trifluoressigsäure-Gruppe mit den stark hydrophilen Eigenschaften der Succinyl-Gruppe gekoppelt enthält.

Die Abspaltung dieser Dicarbonsäure kann sowohl in schwach sauren (pH 4,0), wie schwach basischen (pH 9,5) Puffern durchgeführt werden:



+) Auszugsweise veröffentlicht in Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 265 (1968)

Die Hydroxylgruppen der Aminosäuren Threonin und Serin werden mit TFBA nicht verestert. Im Fingerprint einer Thermolysin-Spaltung von fd_{TFBA} sind nur die Lysinpeptide verändert.
In der ORD zeigt das tetrafluorsuccinylierte Präparat nur noch 16% der nativen Konformation des Hüllproteins (Abb. 12).

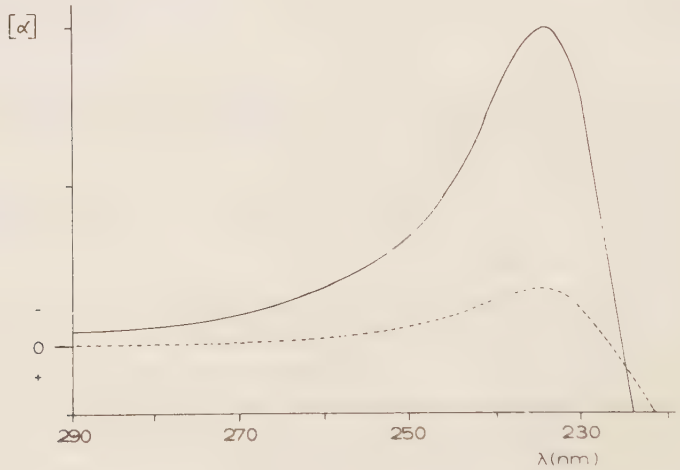


Abb. 12: ORD des nativen Phagen fd (——) und fd_{TFBA} (----)
Das Maximum bei 233 nm von fd_{TFBA} ist um 84% gegenüber fd vermindert.

VII. Bestimmungen von Sequenzen

Die Bestimmung der Reihenfolge der Aminosäuren eines Proteins oder Peptids erfolgt durch schrittweisen Abbau der einander folgenden Aminosäuren.
Eine solche Sequenzermittlung kann nach dem von Edman (43) vorgeschlagenen Verfahren, durch Abbau mit Exopeptidasen und durch die Anwendung von Endgruppenbestimmungsmethoden durchgeführt werden.
Der Edman-Abbau führt über eine cyclisierende Umamidierung zum stufenweisen Abbau vom N-terminalen Ende.

Bei der angewandten Papierstreifenmethode von Shelton und Schroeder (25) wird als Substanzträger Papier verwendet, auf dem der dreistufige Abbau erfolgt. Durch Papierchromatographie werden abschließend die schrittweise abgespaltenen Phenylthiohydantoin-(PTH)-Aminosäuren identifiziert.

Die Spaltung mit Exopeptidasen wird zur Bestimmung von Sequenzen als Freisetzungskinetik für die einzelnen Aminosäuren eines Peptids durchgeführt. Die Aminopeptidasen spalten vom N-Terminus und die Carboxypeptidasen vom C-Terminus schrittweise die Reste ab, die dann auf dem Aminosäureanalysator quantitativ vermessen werden. Mit den bisher bekannten Endgruppenbestimmungsmethoden gelingt nur die Abspaltung einer Aminosäure. Es werden hauptsächlich die chemischen Endgruppenbestimmungen nach Stark und Smyth (44) und die Hydrazinolyse (24) angewendet.

A. Peptide aus der Salzsäurespaltung

Die Peptide I, PC-2, P-2; VII, D50-1 und X aus dem löslichen Teil der Spaltung A mit konz. Salzsäure (Tab. 3) wurden dem Edman-Abbau unterworfen. Die restlichen löslichen Peptide der Salzsäurespaltung konnten bereits bekannten Sequenzen aus Peptiden der peptischen und subtilitischen Spaltung (Asbeck und Köhler, pers. Mitteilung) zugeordnet werden.

I, PC-2, P-2: (Lys, Thr, Gly, Ile_2, Leu)

Edman-Abbau: 1. Schritt: PTH-Thr
2. Schritt: PTH-Ile
3. Schritt: PTH-Gly
4. Schritt: PTH-Ile
5. Schritt: PTH-Lys

Sequenz: Thr-Ile-Gly-Ile-Lys-Leu

VII, D50-1: (Asp, Ala_2, Phe)
Edman-Abbau: 1. Schritt: PTH-Ala
2. Schritt: PTH-Ala
3. Schritt: PTH-Phe
4. Schritt: PTH-Asp
Sequenz: Ala-Ala-Phe-Asp

X: (Asp_2, Glu, Gly, Ala)
Edman-Abbau: 1. Schritt: PTH-Ala
2. Schritt: PTH-Glu
3. Schritt: PTH-Gly
4. Schritt: PTH-Asp
Sequenz: Ala-Glu-Gly-Asp-Asp

Von den Core-Peptiden wurden nur C II und C III näher untersucht, da C I in schlechter Ausbeute auftrat.
Die C-terminale Aminosäure Alanin des Core-Peptids C II (Tab. 4) konnte durch Hydrazinolyse und C'ase-Abbau bestimmt werden.
Die Hydrazinolyse setzte Alanin nach 29 Stunden bei 80°C mit 45% Ausbeute frei.
Nach Behandlung mit Carboxypeptidase A wurde nach 21 Stunden bei 37°C nur die Aminosäure Alanin mit 29% Ausbeute gefunden. Die Weiterreaktion dieser Exopeptidase wurde wahrscheinlich durch Glycin gehemmt, die einzige Aminosäure in C II, die durch C'ase A nur sehr langsam freigesetzt werden sollte (45).

C II: (Gly, Ala_2, Val_4, Met, Ile, Tyr, Try)
Edman-Abbau: 1. Schritt: PTH-Tyr
2. Schritt: PTH-Ala

Der dritte Schritt war bereits nicht mehr eindeutig,da mehrere PTH-Flecken auftraten, und eine eindeutige Zuordnung nicht mehr möglich war. Vermutlich handelte es sich bei diesem Schritt um zersetztes Tryptophan.
Bestimmte Sequenz: Tyr-Ala-(Gly, Val_4, Met, Ile, Try)-Ala

Durch Hydrazinolyse konnte mit 80,5% Ausbeute ferner Valin als C-Terminus des Core-Peptids C III (Tab. 4) identifiziert werden.
C'ase A Partialhydrolyse ergab nach 3 Stunden Valin und Isoleucin im Verhältnis 2 : 1, nach 16 Stunden 2,5 : 1.
C III: (Val_4, Met, Ile)
Edman-Abbau: 1. Schritt: PTH-Met
2. Schritt: PTH-Val
3. Schritt: PTH-Val
4. Schritt: PTH-Val

Der Edman-Abbau im 3. und 4. Schritt war nicht eindeutig, da die Ausbeuten der PTH-Aminosäuren sehr schlecht waren. Das hydrophobe Peptid C III wurde wahrscheinlich durch die Benzolextraktion (s. exp. Teil) während eines Abbau-Cyclus von den Papierstreifen eluiert.
Sequenz: Met-Val-(Val_2, Ile)-Val

Da diese Core-Peptide aus der Salzsäurespaltung nicht völlig durch Edman-Abbau aufgeklärt werden konnten, mußte nach einer weiteren Spaltungsmethode gesucht werden, die aus dem Core-Bereich entsprechende Peptide liefert.
Da die Proteasen Trypsin, Pepsin, Subtilisin, Chymotrypsin und Elastase den "Core-Bereich" in Form von völlig uneinheitlichen, schwer löslichen Peptiden erfaßten, blieb nur noch die Protease Thermolysin übrig, die succinylierte Hüllproteinderivate vollständig spaltete (H. Köhler, pers. Mitteilung).

B. Peptide aus der Spaltung mit Thermolysin

1. Spaltung mit Thermolysin
Durch den Abbau succinylierten und maleinierten Hüllproteins mit Thermolysin (34) gelang es erstmalig H. Köhler, mit einer enzymatischen Methode aus allen Sequenzbereichen Peptide zu erhalten.

Die neutrale Protease Thermolysin (46) besitzt in ihrem aktiven Zentrum ein Calcium-Ion und kann mit EDTA inaktiviert werden. Sie zeigt keine ausgeprägte Spaltungsspezifität und führt bei Inkubationen über 20 Stunden zur Freisetzung von Dipeptiden und Aminosäuren. Ihr Temperaturoptimum liegt zwischen 40 und 60°C.
Der Fingerprint der Thermolysinspaltung (ThL-Spaltung) von fd_{succ} (Abb. 13) ist verhältnismäßig einfach. Durch die Acylierung treten ausschließlich saure und neutrale Peptide auf.

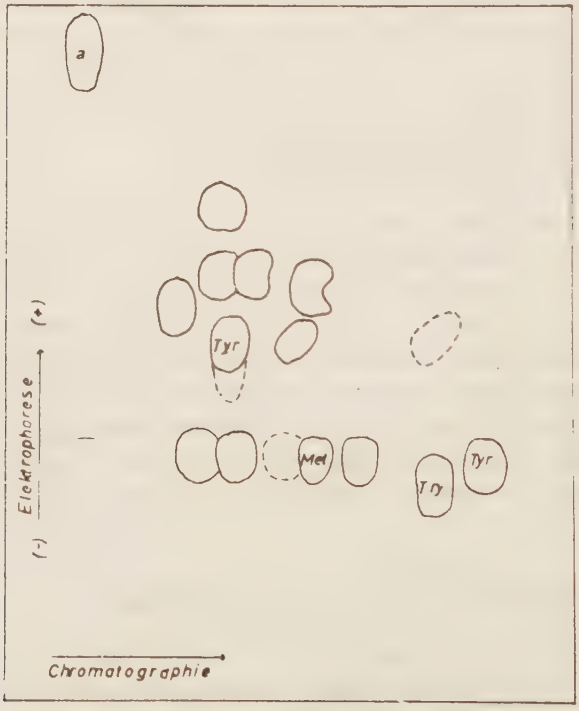


Abb. 13: Fingerprint von ThL fd_{succ}. Gegeben sind alle ninhydrinpositiven Flecken und ein ninhydrinnegativer Fleck (a). Tyrosin, Tryptophan und Methionin wurden durch Farbreaktionen (48) bestimmt.

Die Zahl der acylierten Peptide ist aus dem "Diagonal-Fingerprint" (Abb. 14) zu ersehen. Die Diagonaltechnik von Hartley (47) kombiniert zwei um 90° gegeneinander verdrehte Papierhochspannungselektrophoresen miteinander. Die erste Elektrophorese wurde mit ThL-Peptiden von fd_{mal} durchgeführt, an die nach Abspaltung der Maleinylgruppen bei pH 3,5 rechtwinklig zur ersten Laufrichtung die zweite Elektrophorese angeschlossen wurde.

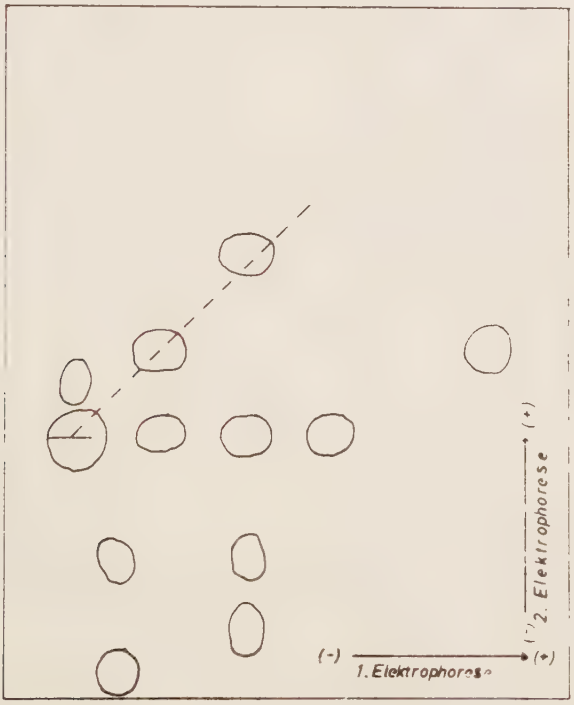


Abb. 14: "Diagonal-Fingerprint" von ThL fd_{mal}
Vor der zweiten Laufrichtung wurden die mal-Gruppen entfernt. Gegeben sind alle ninhydrin-positiven Flecken.

Da nach der ThL-Spaltung acylierter Proteine, die wie das Hüllprotein des fd-Phagen kein Arginin enthalten, ausschließlich neutrale und saure Peptide auftreten, entstehen große Trennprobleme. Wird aber die Acylgruppe wieder entfernt, so treten wieder basische Peptide (Lysin-Peptide) auf, und die Trennprobleme für die Peptide sind die gleichen wie bei der Spaltung unmodifizierter Proteine. Auf diesem Umweg gelingt es, Peptide mit Aminosäuren, wie sie in der Peptidkette vorliegen (unmodifiziert), durch enzymatische Spaltung des fd-Hüllproteins zu erhalten. Außer der Maleinyl-Gruppe eignet sich für diese Verfahrensweise die Tetrafluorsuccinyl-Gruppe.

2. Peptide aus der Spaltung mit Thermolysin
Die ThL-Peptide wurden über Sephadex G 25 (Abb. 15) vorfraktioniert. In den vier Hauptgipfeln I bis IV sind 18 Peptide enthalten. Gipfel I, III und IV enthalten jeweils nur ein Peptid.

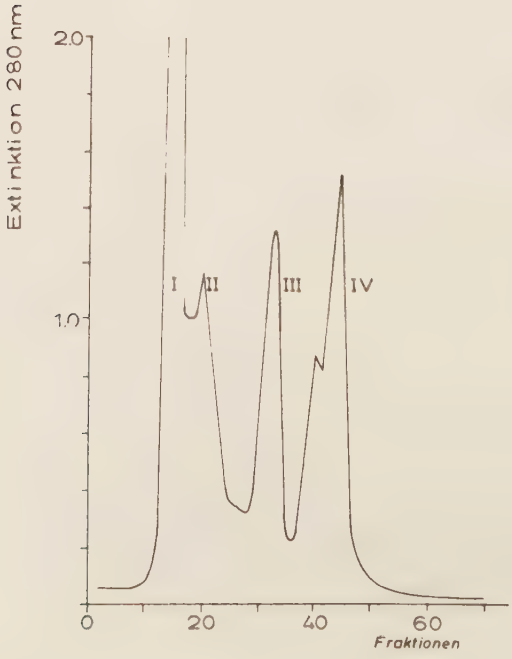


Abb. 15:
Chromatographie der ThL-Peptide von fd_{succ} über Sephadex G 25.

Ausgezogene Linie: Extinktion bei 280 nm

Die Reinigung der Peptide gelang säulenchromatographisch über Dowex 1 x 2 und durch Papierelution im Anschluß an die Gelfiltration über Sephadex G 25.
Die Aminosäurezusammensetzung der Peptide ist aus Tabelle 7 ersichtlich. Die durchschnittliche Größe der isolierten Spaltstücke liegt bei 3 Aminosäuren. Diese Tatsache hat die Reinigung sehr erschwert, da mehrere Peptide mit gleichem Rf-Wert auftraten. Einige Peptide zeigten einen sehr hohen Rf-Wert im Partridge-Chromatographiesystem. Den höchsten Rf-Wert hatte das Valintripeptid.

	I	II																	III	IV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
Lys	1											1	2	1	2		1			
Asp	2		1																	
Thr						1				1						1				
Ser			1		1												1	1		
Glu	1			1		1														
Pro	1																			
Gly	1								1		1									
Ala	2	2			1	1				1										
Val								3	1											
Met							1													
Ile									1		1	1		1						
Leu				1								1			1					
Tyr						1													1	
Phe			1										1		1	1				
Try																				1
Σ	8	2	3	2	2	4	1	3	3	2	2	3	3	2	4	2	2	2	3	1

Tab. 7: Zusammensetzung der Peptide aus der Spaltung des succinylierten Hüllproteins mit Thermolysin.

Das Peptid II, 1 enthält nur Alanin, hat aber einen viel höheren Rf-Wert als freies Alanin. II, 1 ist ein Dipeptid Ala-Ala.
Das Dipeptid II, 3 verhält sich elektrophoretisch wie ein Neutralpeptid und zeigt nach dem Edman-Abbau die Sequenz: Leu-Gln. Dieser Glutaminrest ist das einzige in der Peptidkette gefundene Säureamid.
Das Tripeptid II, 2 (Phe, Asp, Ser) wandert in der Hochspannungspapierelektrophorese bei pH 5,4 anodisch und enthält demnach einen Asparaginsäurerest.
Das Tetrapeptid II, 5 (Thr, Glx, Ala, Tyr) verhielt sich unmittelbar nach der Thermolysinspaltung in der Hochspannungspapierelektrophorese bei pH 5,4 wie ein Neutralpeptid. Nach der Gelfiltration bei pH 8,5 oder Zugabe von Eisessig bis pH 3,5 zum Abstoppen der Spaltung - an Stelle der normalerweise angewandten Gefriertrocknung - zeigte es die charakteristische anodische Wanderung negativ geladener Peptide. Es ist durchaus denkbar, daß durch eine Veresterung der freien Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit der Hydroxylgruppe des Threoninrestes ein neutrales Peptid vorgetäuscht werden kann. Erfahrungsgemäß werden Säureamide bei pH 8,5 oder pH 3,5 nicht desamidiert.
Der direkte Nachweis des N-terminalen Peptids I gelang nicht mit der Ninhydrinfarbreaktion, da keine freien Aminogruppen für diese Reaktion zur Verfügung stehen. Sie sind durch Bernsteinsäure blockiert. Für dieses ninhydrinnegative Peptid wurde die Nachweisreaktion von Reindel (49) benützt. Dabei wird das chlorierte Peptid durch Besprühen mit o-Toluidin gelb angefärbt.
Das Dipeptid IV wurde enzymatisch hydrolisiert, da es mit Ehrlichs Reagenz angefärbt wird und demnach Tryptophan enthält. Auf diese Weise konnten die Aminosäuren dieses Peptids auf dem Aminosäureanalysator im Verhältnis 1 : 1 - Alanin und Tryptophan - bestimmt werden. Im Edman-Abbau ergab sich als erste PTH-Aminosäure PTH-Ala und im 2. Schritt PTH-Try. Damit konnte erstmalig eindeutig die Nachbaraminosäure von

Tryptophan festgelegt werden. Diese Sequenz wurde zusätzlich noch durch enzymatische Hydrolyse des PTH-Derivats dieses Dipeptids, die auf dem Aminosäureanalysator nur Tryptophan ergab, gesichert. Die N-terminale Aminosäure Alanin war auf dem Analysator als PTH-Alanin nicht mehr nachweisbar (keine Ninhydrinfarbreaktion).
Ein methioninhaltiges Dipeptid (Met, Ala) konnte nicht gefunden werden. Ein Dipeptid dieser Zusammensetzung stellte sich als ein Gemisch aus ThL II, 1 und ThL I, 7, dem Dipeptid Ala-Ala und freiem Methionin, heraus.

VIII. Sequenz der Untereinheit des Hüllproteins[+)]

A. Überlappungspeptide

Nach der Ermittlung der Bruttoformel und Isolierung von Peptiden aus Spaltungen einer Polypeptidkette wird zur Zuordnung der einzelnen Bruchstücke nach Überlappungspeptiden gesucht. Diese Brückenpeptide können im günstigsten Fall innerhalb des Gemisches von Peptiden einer Spaltung gefunden werden, die Zuordnung wird aber in einem solchen Fall sehr schwierig. Normalerweise wird versucht, an Hand der tryptischen Peptide, die alle mit Ausnahme des carboxylständigen Peptids die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin C-terminal tragen, die Reihenfolge mit Hilfe von peptischen oder chymotryptischen arginin- und lysinhaltigen Überlappungspeptiden festzulegen. Meist werden beide Spaltungen zur eindeutigen Zuordnung benötigt. Beim Hüllprotein des Phagen fd versagt diese Methode, da die 5 Lysinreste der Kette sehr eng beieinander liegen, und auf diese Weise weniger als 30% der Aminosäuren in tryptischen Peptiden wiedergefunden werden konnten. Außerdem gelang es nicht, alle tryptischen Peptide zu isolieren.

+) Auszugsweise veröffentlicht: G. Braunitzer, F. Asbeck, K. Beyreuther, H. Köhler und G. v. Wettstein in Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, S. 725 und S. 1689 (1967)

Ein sauberes und einheitliches 31 Aminosäuren umfassendes tryptisches Mittelbruchstück (Core) aus der Polypeptidkette konnte nicht gefaßt werden. Bei der peptischen Spaltung fehlten ebenfalls einige Peptide aus dem Mittelstück. Die Protease Subtilisin setzte Peptide mit insgesamt 30 der 49 Aminosäuren aus dem Peptidverband frei und hinterließ ebenfalls ein heterogenes nahezu unlösliches Core. Ganz anders liegen dagegen die Verhältnisse bei der partiellen Salzsäurehydrolyse und der Spaltung des acylierten Hüllproteins mit Thermolysin. Beide Abbaumethoden erfaßten auf Peptidebene den ganzen Sequenzbereich.
Die äußerst unspezifische langzeitige Salzsäurespaltung lieferte aus gleichen Bereichen mehrere Peptide, so daß bis auf zwei Stellen (Tafel 1) allein durch diese Spaltung eine Zuordnung aller Peptide möglich wurde. Zur Schließung der zwei verbleibenden Lücken konnten von Asbeck isolierte Peptide aus der peptischen Spaltung herangezogen werden.

Jedoch wäre eine Zuordnung aller HCl-Peptide infolge der bekannten C-terminalen Sequenz des Proteins möglich, da sie eine Zuordnung der zwei nicht durch Überlappungen eindeutig festgelegten Peptide durch Ausschluß aller anderen Positionen zuläßt.
Die sehr kleinen Bruchstücke nach Abbau mit Thermolysin eigneten sich nicht als Brückenpeptide. Sie ermöglichten jedoch die Sequenzermittlung des Core-Bereichs, da das HCl-Core C II im Edman-Abbau nur für zwei Schritte eindeutige Ergebnisse erbrachte.

B. Sequenz der Hüllproteinuntereinheit

Die Primärstruktur der Hüllproteinuntereinheit des Phagen fd zeigt Tafel 1. Es wurde aus allen angewandten Spaltungen kein Peptid gefunden, das nicht in diese Formel paßt. Im folgenden werden die Beweise für diese Sequenz aufgeführt.

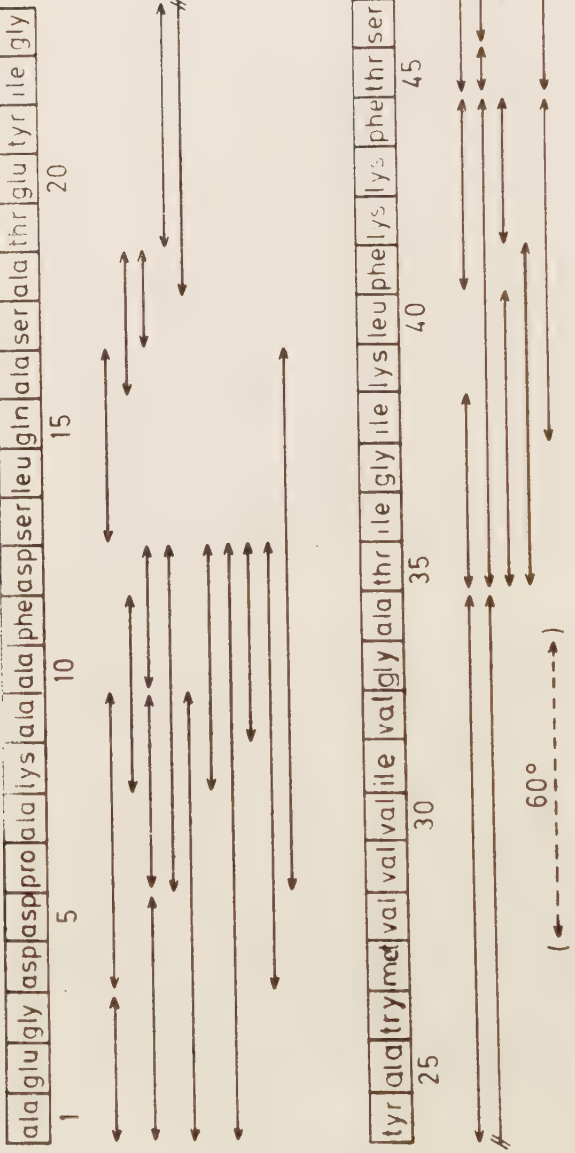
1. Die Zeichensprache

Alle Sequenzen sind vom N- zum C-Terminus geschrieben. Ganz links steht immer die Aminosäure mit der freien NH_2-Gruppe, ganz rechts die Aminosäure mit der freien COOH-Gruppe.
Die Peptidkette der Untereinheit des Hüllproteins besteht aus 49 Aminosäuren, die von 1 bis 49 durchnumeriert sind.

Waagrechte Linien unter der Sequenz geben Größe und Zusammensetzung gewonnener Peptide an. Die systematische Bezeichnung der Peptide befindet sich unter diesem Doppelpfeil. Links außen ist jeweils die Spaltung angegeben, aus der die entsprechenden Peptide stammen.
Aufgeführt sind sämtliche Peptide aus der Salzsäurespaltung (HCl), Thermolysinspaltung (ThL), Spaltung mit Pepsin (P), Trypsin (T) und Subtilisin (S).
Kleine waagrechte Pfeile unter der Peptidlinie deuten ausgeführte Sequenzbestimmungen an. Die Pfeilspitzen zeigen in die Richtung, in der das Peptid abgebaut wurde. Pfeile nach rechts weisen auf Edman-Abbau, Pfeile nach links auf Abbau mit C'ase oder auf Hydrazinolyse hin. Die Anzahl der Pfeile gibt die Zahl der nacheinander ausgeführten Abbauschritte an.

2. Begründung der Primärstruktur

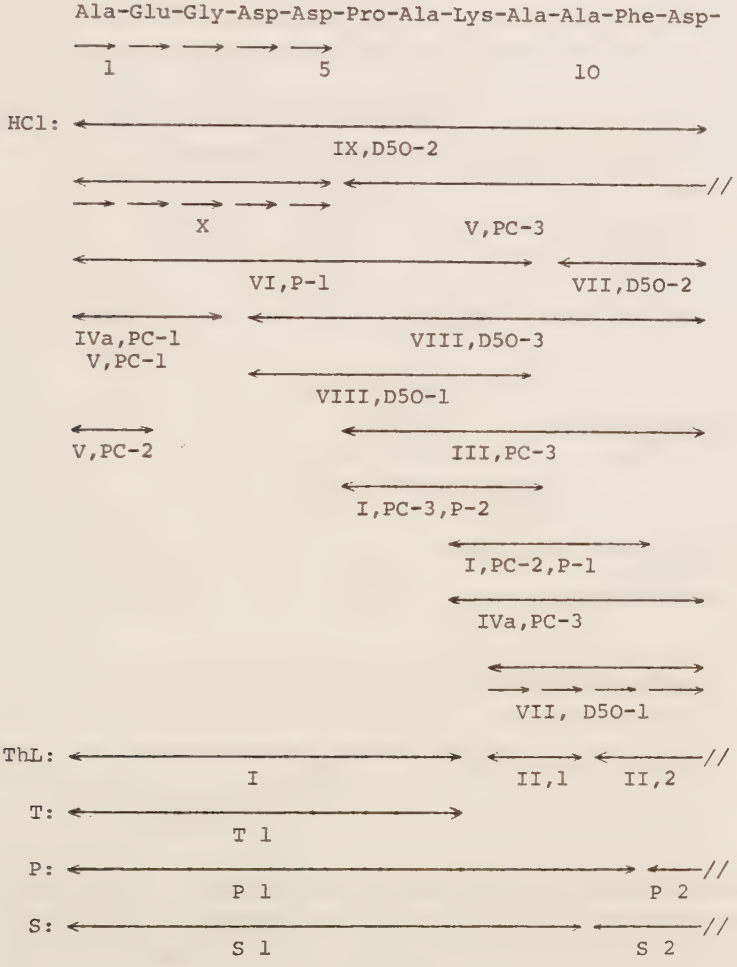
Die Sequenz der Hüllproteinuntereinheit (Tafel 1) soll im folgenden an Hand der Peptide aus der HCl-Spaltung so weit dies möglich ist, bewiesen werden.
Sequenz 1 bis 24 und neun C-terminale Sequenzen konnten bereits an Hand der peptischen und subtilitischen Peptide von Asbeck und Köhler (pers. Mitteilung) vor der Durchführung der Salzsäurespaltung bestimmt werden. Unklar war nur noch die Anzahl der Säureamide.
Alle hier zur Begründung erforderlichen Angaben aus der peptischen und subtilitischen Spaltung stammen aus den Untersuchungen von Asbeck und Köhler (unveröffentlichte Ergebnisse). Die Peptide aus der Spaltung mit Thermolysin wurden



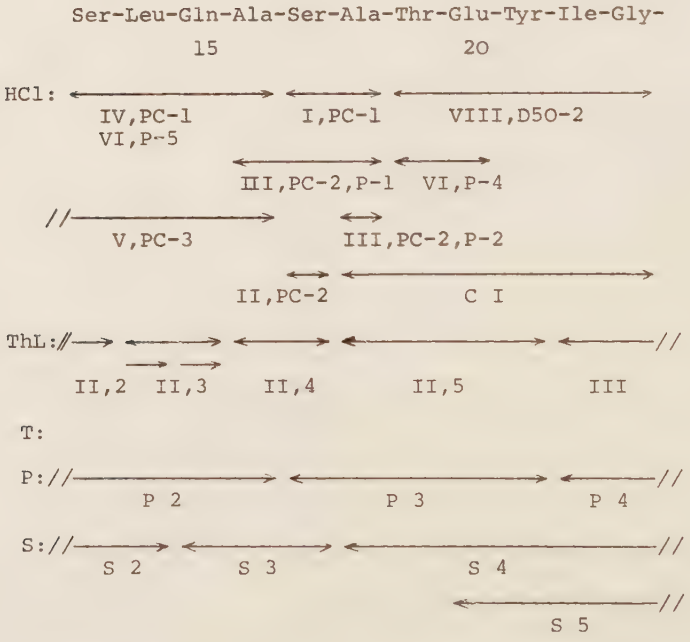
Tafel 1:

Die Primärstruktur der Untereinheit des Hüllproteins des Bakteriophagen fd mit den Peptiden aus der partiellen Salzsäurehydrolyse (Pfeile unter der Sequenz geben die Länge der einzelnen Peptide an).

erstmalig von Köhler (pers. Mitteilung) isoliert. Da jedoch das Methioninpeptid und das Tryptophanpeptid sich als uneinheitlich und verunreinigt herausstellten, wurden die Thermolysinspaltung wiederholt und die in Tab. 7 zusammengestellten Peptide gefunden.
Die vorliegende Struktur ist das Ergebnis einer Gruppenarbeit.

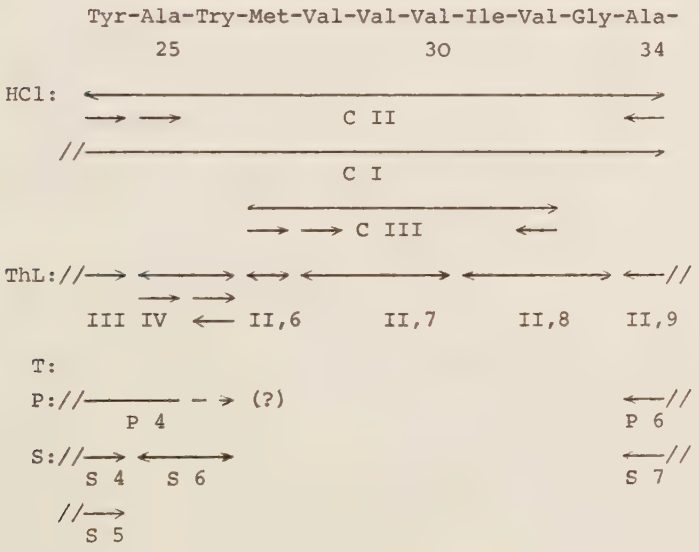


Die N-terminale Sequenz 1 bis 5 wurde durch Edman-Abbau am Gesamtprotein gesichert. Damit konnte am Protein direkt nachgewiesen werden, daß von den drei Dicarbonsäuren aus diesem Bereich keine amidiert ist. Die Aminosäure in Position 12 ist ebenfalls nicht amidiert, wie sich aus dem sauren Verhalten von Peptid ThL II,2 in der Hochspannungspapierelektrophorese schließen läßt. Somit befindet sich im Bereich 1 bis 12, der vom N-terminalen HCl-Peptid IX, D50-2 erfaßt wird, kein einziges Säureamid. In diesem Sequenzteil liegen alle Asparaginsäurereste des Moleküls. Insgesamt 13 HCl-Peptide können in diesen Bereich eingeordnet werden. Peptid V, PC-3 ist das einzige Überlappungspeptid der HCl-Spaltung zum anschließenden Kettenteil.

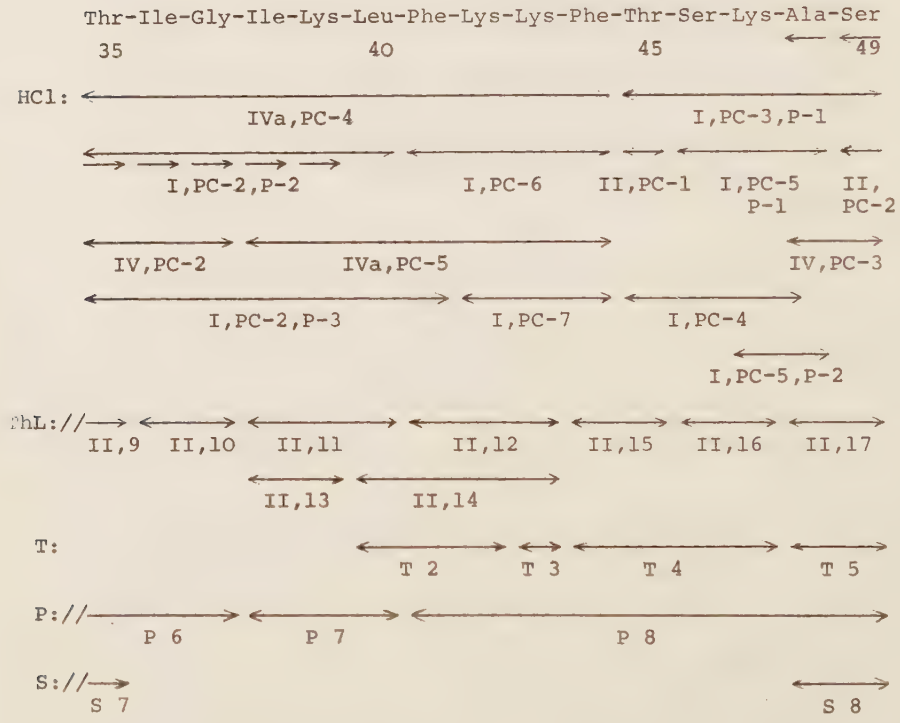


Die Glutaminsäure in Position 15 ist amidiert, wie sich aus dem Edman-Abbau und dem elektrophoretischen Verhalten von ThL II,3 (Neutralpeptid) folgern ließ. Über Rest 20 kann je-

doch nicht eindeutig gesagt werden, ob es sich um das Säureamid oder die freie Dicarbonsäure handelt. Das elektrophoretische Verhalten von ThL II,5 deutet eher auf das Vorliegen eines Glutaminsäurerests als auf einen Glutaminrest. Peptid ThL II,5 verhält sich in der Hochspannungspapierelektrophorese wie ein Neutralpeptid direkt nach der Thermolysinspaltung. ThL II,5 wandert jedoch nach Sephadexchromatographie oder kurzzeitiger saurer Inkubation bei pH 3,5 anodisch wie ein saures Peptid. Das Verhalten dieses Peptids deutet auf eine chemische Nebenreaktion während der Thermolysinspaltung der freien Carboxylgruppe von Glu 20 mit der freien Hydroxylgruppe von Thr 19. Eine auf diese Weise gebildete Esterbindung wird dann unter den angegebenen Bedingungen sehr leicht hydrolysiert. Eine Bestimmung der sich in diesem N-terminalen Bereich befindlichen Säureamide nach der peptischen, subtilitischen und Salzsäure-Spaltung war nicht möglich, da während der Denaturierung in konz. Ameisen- und konz. Salzsäure eine Desaminierung vorkommt.



Durch die Core-Peptide C I, C II und C III wird erstmalig der ganze Mittelbereich von Position 18 bis 34 der Peptidkette erfaßt. Sequenz 1 bis 24 war bereits ohne Kenntnis der Peptide aus der Salzsäurespaltung bekannt.
Position 24 und 25 konnten durch Edman-Abbau von C II bestimmt werden.
Da mit C'ase von C II nur Alanin als einzige Aminosäure in guter Ausbeute freigesetzt wurde, mußte auf Glycin in vorletzter Position geschlossen werden. Glycin ist die einzige Aminosäure in C II, für die eine sehr niedrige Freisetzungsrate von Carboxypeptidase A bekannt ist (45).



Die längere Zeit unsichere Position des einzigen Tryptophanrestes der Kette konnte endgültig durch Edman- und C'ase-Abbau von ThL IV festgelegt werden. Eine anders vorgeschlagene Sequenz im Bereich 25 - 27 (Asbeck und Köhler) war eine Folge von Zersetzungsreaktionen des Tryptophanrests während der Spaltungen oder der Aufarbeitungen der Peptide.
Die Lage des einzigen Methioninrestes der Kette wurde durch Edman-Abbau von C III festgelegt, das einen Teilbereich von C II und C I darstellt.
Die Zuordnung der verbleibenden Aminosäuren gelang mit den ThL-Peptiden II,7 und II,8 (Köhler, pers. Mitteilung). Im C-terminalen Teil von Position 35 - 49 nimmt die Anzahl der aufgetretenen und isolierten HCl-Peptide wieder stark zu. Aus diesem Bereich stammen 14 HCl-Peptide.
Hier liegen die zwei Bereiche, für die sich aus der Salzsäurespaltung allein keine Überlappungen ergeben und deren Peptide aus dieser Spaltung sich ohne zusätzliche Ergebnisse nicht eindeutig zuordnen lassen. Zwischen den Positionen 34 und 35 sowie 44 und 45 der Sequenz gibt es innerhalb der Salzsäurespaltung keine Überlappungen. Auf Grund der Kenntnis der C-terminalen Sequenz Ala-Ser der Peptidkette lassen sich jedoch Peptid I,PC-3, P-1 als C-terminales und Peptid IVa, PC-4 als Anschlußpeptid an C I und C II zuordnen, und somit ist allein durch die Salzsäurespaltung die Partialformel der Hüllproteinuntereinheit bei Kenntnis der C-terminalen Sequenz lückenlos belegt.
Sequenz 41 bis 49 war bereits bekannt (Asbeck und Köhler, pers. Mitteilung). Sequenz 35 bis 40 konnte durch Edman-Abbau von I,PC-2, P-2 bestimmt werden.
Die Zuordnung der C-terminalen Peptide aus der peptischen Spaltung erfolgte erstmalig durch die Peptide aus der Salzsäurespaltung.
Die große Anzahl der HCl-Peptide ermöglichte nicht nur die Aufstellung der kompletten Partialformel der Hüllproteinuntereinheit des Phagen fd, sondern auch die Bestimmung einer Reihe von Sequenzen auf Grund von Überlappungen.

IX. Hüllproteine fd-ähnlicher Phagen

A. Hüllprotein der Phagen f 1, M 13 und ZJ 2

Aufzucht und Reinigung der einzelnen Phagen wurde analog der für den Phagen fd angewandten Methoden durchgeführt. Die drei Phagen f 1, M 13 und ZJ 2 sind nicht nur morphologisch fd sehr ähnlich (14), sondern auch serologisch fast nicht voneinander zu unterscheiden (13). Daß es sich um verschiedene Phagen handelt, ging bisher eindeutig nur aus dem biologischen Test von Arber (19) für einen Teil dieser Gruppe von Phagen hervor. Der Restriktionstest von Arber nützt als Unterscheidungsmerkmal für diese DNS-haltigen Phagen die unterschiedliche Anpassungsfähigkeit der DNS an einen bestimmten Wirt (E. coli) aus. f 1 und fd verhalten sich in diesem Test fast gleich, während ein weiterer Phage F 12 (13) eine Ähnlichkeit zu M 13 zeigt. ZJ 2 wurde noch nicht getestet.

Für einen Teil dieser Phagen ist nun zusätzlich eine Unterscheidung auf Grund der Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins (Tabelle 8) möglich. Nur ZJ 2 zeigt einen deutlichen Unterschied zu fd. f 1 ergab keine eindeutig zu interpretierenden Analysen. M 13 hat die gleiche Aminosäurezusammensetzung des Hüllproteins aufzuweisen wie fd. ZJ 2 enthält verglichen mit fd einen Threoninrest weniger und einen Alaninrest mehr pro Hüllproteinuntereinheit. f 1 scheint sich von fd durch einen zusätzlichen Glutaminsäurerest und das Fehlen eines Alaninrests zu unterscheiden. Die ersten fünf Aminosäuren sind bei fd, f 1 und ZJ 2 gleich, wie der Edman-Abbau am Gesamtprotein ergab.

Für den Phagen f 1 wurde versucht, den Austausch an Hand der bekannten Sequenz der Hüllproteinuntereinheit von fd durch Vergleich der Peptide aus der Thermolysinspaltung acylierter Präparate zuzuordnen.

Bakteriophage	f 1			M 13			ZJ 2			fd++
Hydrolysezeit	20	200	M	20	100	M	20	200	M	M
Lysin	4.79	–	5	4.61	–	5	4.99	–	5	5
Asparaginsäure	3.30	3.26	3	3.03	–	3	3.06	2.92	3	3
Threonin	2.87	–	3	3.03	–	3	2.10	–	2	3
Serin	4.02	–	4	4.34	–	4	3.89	–	4	4
Glutaminsäure	3.65	3.54	3-4	3.97		3	2.93	2.84	3	4
Prolin	1.47	1.35	1	1.17	–	1	1.12	1.07	1	1
Glycin+	4.03	3.98	4	4.10	–	4	4.25	4.00	4	4
Alanin	7.91	8.61	8-9	8.67	8.83	9	10.40	10.15	10	9
Valin	2.73	3.94	4	1.95	3.56	4	3.35	3.57	4	4
Methionin	1.02	0.94	1	0.67	–	1	0.24	–	1	1
Isoleucin+	3.68	4.33	4	3.28	3.45	4	3.86	3.84	4	4
Leucin	2.26	2.21	2	2.09	2.17	2	2.13	2.08	2	2
Tyrosin	1.61	–	2	2.07	–	2	2.04	1.75	2	2
Phenylalanin	2.55	2.89	3	2.99	–	3	3.03	2.94	3	3
Tryptophan	+	–	1	+	–	1	+	–	1	1
Gesamt:			48-49			49			49	49

\+ Werte wie in Tab. 2 korrigiert
++ aus Tab. 2

Tab. 8: Aminosäurezusammensetzung der Hüllproteine der Phagen f 1, M 13 und ZJ 2 verglichen mit fd. Die Analyse von M 13 wurde von v. Wettstein+) durchgeführt und auf ein Molekulargewicht von 5169 für die Untereinheit umgerechnet. Tryptophan wurde optisch bestimmt (s. exp. Teil).

+) G.v.Wettstein, unveröffentlichte Ergebnisse

B. Sequenzermittlung des Hüllproteins von f 1

Der Unterschied im Hüllprotein von fd und f 1 ist klein. Ein Austausch Ala → Glu läßt sich bereits durch Austausch einer Base eines Tripletts der DNS erklären. Für den Unterschied Ala → Gln dagegen wäre ein Austausch zweier Basen anzunehmen.
Die Frage, ob es sich um einen polaren Ala-Glu oder einen unpolaren Ala-Gln Austausch handelt, sollte sich mit Hilfe der Fingerprinttechnik wie beim Sichelzellhämoglobin (HbS) klären lassen (50). HbS unterscheidet sich von HbA (adultes Hämoglobin) durch einen Glu → Val Austausch in Position 6 der ß-Kette. Im tryptischen Hydrolysat tritt ein neues basisches Peptid an Stelle eines Neutralpeptids. Bei einem unpolaren Austausch versagt die Printmethode.
Beim Phagen f 1 mußte ein Spaltungsweg eingeschlagen werden, der Peptide aus allen Bereichen der Hüllproteinuntereinheit liefert, da Alanin über die ganze Kette verteilt ist. Dazu eignet sich die Thermolysinspaltung des acylierten Hüllproteins. Diese einzig in Frage kommende enzymatische Abbaumethode liefert ein verhältnismäßig einfaches Peptidspektrum aus dem gesamten Sequenzbereich. Die einzelnen Peptide für fd waren bekannt und konnten eindeutig zugeordnet werden, so daß ein Peptidvergleich von f 1- und fd-Peptiden mit großer Wahrscheinlichkeit Rückschlüsse auf die Sequenz erlauben sollte.
Die thermolytischen Fingerprints von f 1 (Abb. 16) und fd (Abb. 13) zeigen bis auf das N-terminale Oktapeptid das gleiche Peptidmuster. Dieses Peptid konnte jedoch nur mit dem Reindel-Reagenz (49) angefärbt werden, da alle freien Aminogruppen blockiert sind und keinen Ninhydrinfarbstoff bilden können. Das Auftreten von zwei ninhydrinnegativen Peptiden deutet auf das Vorliegen einer uneinheitlichen Substanz, da die Thermolysinspaltung unter den gewählten Bedingungen nur ein N-terminales Peptid freisetzt.
Ein Peptid verhält sich elektrophoretisch wie ThL I von fd (Tab. 7). Das andere Peptid wandert schneller anodisch als ThL I von fd.

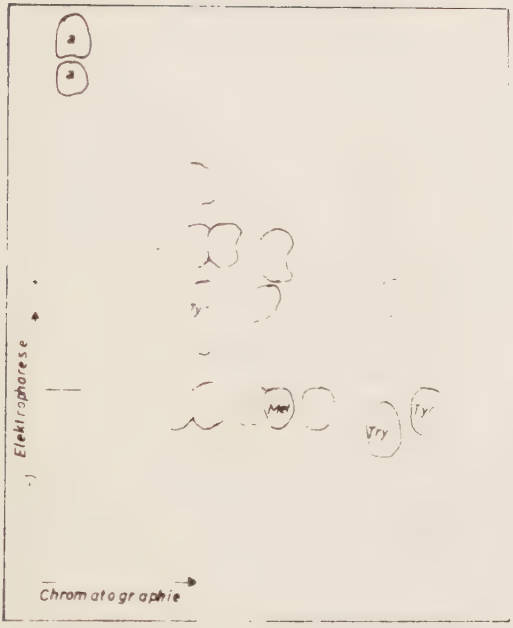


Abb. 16:
Fingerprint von ThL f 1_{succ}
Gegeben sind alle mit Ninhydrin und Reindel-Reagenz (a) anfärbbaren Flecken. Peptide mit Tyrosin, Tryptophan und Methionin wurden durch Farbreaktionen bestimmt (48).

Die Vortrennung des thermolytischen Hydrolysats erfolgte wie beim Phagen fd über Sephadex G 25 (Abb. 15) und ergab das gleiche Elutionsprofil. Gipfel I enthält neben der DNS die N-terminalen Oktapeptide. Die hohe negative Ladung dieses maleinierten oder succinylierten Peptids führte dazu, daß dieses Bruchstück auf Grund seiner stark hydrophilen Eigenschaften mit der Front von Sephadex G 25 (scheinbares Molekulargewicht von über 5000) eluiert wird. Im Gipfel II befindet sich der Hauptanteil der Peptide, die über Dowex 50 x 2 (Abb. 17) getrennt wurden. Gipfel III enthält das Tripeptid ThL III: Ile-Gly-Tyr (Sequenz 22 - 24) und Gipfel IV das Dipeptid ThL IV: Ala-Try (Sequenz 25 - 26).
Bis auf das N-terminale Peptid ThL I aus Gipfel I wurde kein Unterschied in der Zusammensetzung der thermolytischen Peptide von fd und f 1 gefunden (Tabelle 9).

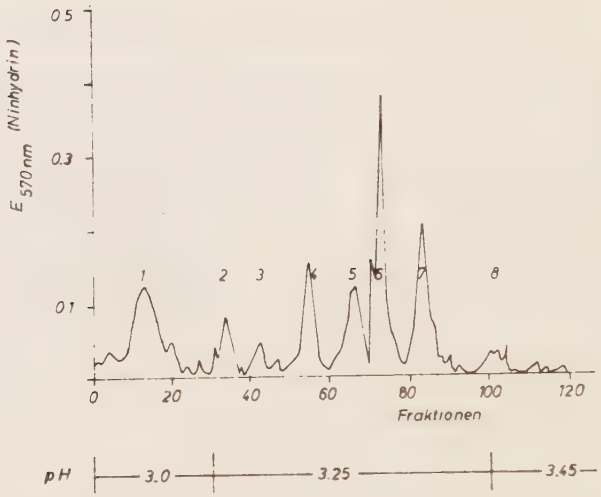


Abb. 17: Dowex-50-Lauf der ThL-Peptide von f 1 aus Gipfel II der Vortrennung über Sephadex G 25. Säule: 40 x 1,5 cm

Eine zweite Thermolysinspaltung wurde mit einem maleinierten Hüllproteinderivat durchgeführt. Nach Abspaltung der Maleinyl-Gruppen bei pH 3,5 (37°C) wurde die Fraktion mit ThL I über DEAE-Cellulose chromatographiert. Eine vollständige Trennung der zwei vermuteten Oktapeptide, ThL I von fd und ThL I von f 1 mit einem Ala → Glu Austausch gelang nicht. Es zeigte sich nur ein breiter Doppelgipfel.

Die Aminosäureanalysen der Randfraktionen zeigen, daß Fraktion 2 (der Anteil mit den meisten negativen Ladungen) noch immer etwa 70% von Fraktion 1, dem ThL-Peptid I von fd_{succ}, enthält. Eine Auftrennung der beiden homologen Peptide gelang auch nicht durch Papierelution nach Papierchromatographie.

Analysen von DEAE 1 und 2 (Auftrennung von ThL I f 1):

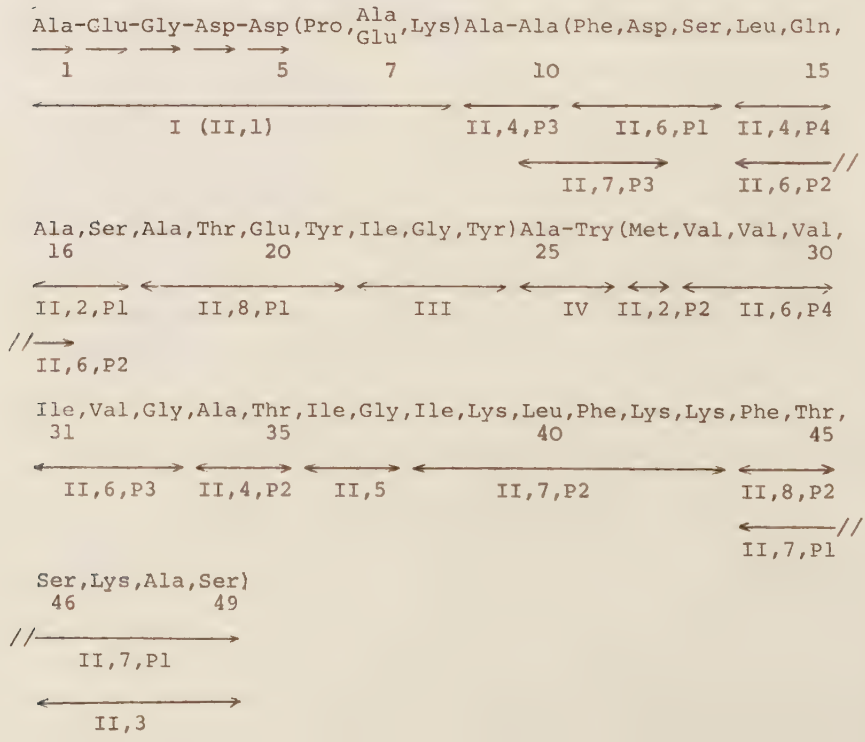
	Lys	Asp	Glu	Pro	Gly	Ala
DEAE 1:	1	2	1	1	1	2
DEAE 2:	1	2	1,5	1	1	1,8

Peptid	I	II (Dowex 50)																III	IV
	1	2 P1	2 P2	3	4 P1	4 P2	4 P3	4 P4	5	6 P1	6 P2	6 P3	6 P4	7 P1	7 P2	7 P3	8 P1	8 P2	
Lys	0.82	0.86											1.08	2.77					
Asp	2.04	2.10		0.81					0.99						1.20				
Thr					0.99								0.93			1.14	1.12		
Ser		1.00		2.03	1.03				1.16				2.03						
Glu	1.46	1.56						1.04		1.05						1.16			
Pro	0.82	1.28																	
Gly	1.18	1.03							1.04		1.13							1.01	
Ala	1.65	1.78	1.00							0.89			1.03	0.94	1.10				0.99
Val				1.15	0.97	1.01	2				1.05	3							
Met			1																
Ile								0.96			0.82		1.23					0.91	
Leu								0.96		1.05			1.03						
Tyr																0.59		1.07	
Phe									0.85				0.93	0.97	0.86		0.88		
Try																			1.01
Σ	8	8	2	1	4	2	2	2	2	3	3	3	3	6	6	3	4	2	3	2

Tab. 9: Aminosäurezusammensetzung der Peptide der ThL-Spaltung von f l_{succ}.
Peptid IV wurde enzymatisch hydrolysiert.

Das biologische Material von f 1 (infektiöses Material von Zinder) scheint ein Gemisch aus einem Phagen mit dem gleichen Hüllprotein wie fd und einem Phagen, der einen Ala → Glu Austausch in der Hüllproteinuntereinheit zeigt, zu sein.

Da beim Edman-Abbau am Gesamtprotein (5 Schritte) dieses Phagengemisches im 1. Schritt eindeutig nur PTH-Alanin gefunden wurde, muß der Austausch des zweiten Alaninrests im N-terminalen Oktapeptid gegen einen Glutaminsäurerest (polarer Austausch, Abb. 16) in Position 7 angenommen werden. Der Phage mit dem veränderten Hüllprotein stellt nur eine Minorkomponente dar und macht dadurch eine endgültige Festlegung des Austausches durch Sequenzbestimmung unmöglich. Eine Trennung des heterogenen Phagenmaterials in der trägerfreien Elektrophorese in die zwei Komponenten wird die endgültige Klärung bringen, ob der Austausch Ala → Glu für Position 7 der Hüllproteinuntereinheit festzulegen ist. Aus den Peptiden der Thermolysinspaltung von f 1_{succ} (Tab. 9) kann für die Hüllproteinuntereinheit von f 1 auf Grund der bekannten Sequenz von fd folgende Formel aufgestellt werden:



X. Diskussion

A. Mögliche Fehlerquellen

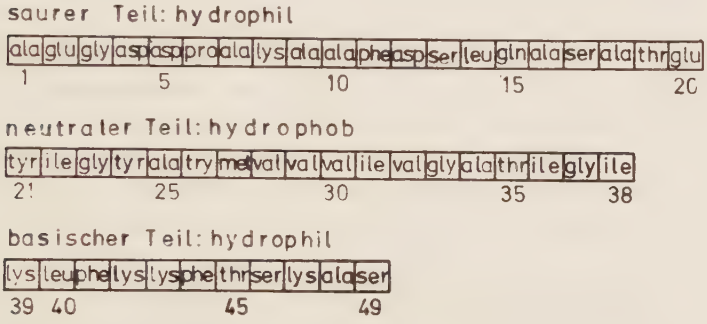
Die Fehlerbetrachtung eines komplexen analytischen Ergebnisses erfordert sowohl die kritische Erörterung der angewandten Methoden wie der Schlüsse, die zum Gesamtergebnis geführt haben.
Von den heute in der Proteinchemie bekannten Analysenmethoden stellt die Aminosäureanalyse nach Stein und Moore (51) eine sehr sichere Bestimmungsmethode dar. Der Bestimmungsfehler bei einer Peptidanalyse zur Festlegung der Molverhältnisse liegt unterhalb von 5 Prozent.
Der Hauptfehler bei der Aufstellung einer Bruttoformel eines Proteins oder Peptids ist durch Verunreinigungen bedingt. Deshalb wurde jedes analysierte Peptid papierchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft, bevor es auf dem Analysator vermessen wurde.
Eine zusätzliche Fehlerquelle liegt in der Totalhydrolyse von Eiweißstoffen, da einige Aminosäuren zerstört oder bei der gewählten Standardhydrolysenzeit von 20 Stunden durch sterische Hinderung nicht völlig aus dem Peptidverband befreit werden. Für die hydrolyselabilen Aminosäuren sind Zerfallskonstanten bekannt. Durch die Kontrolle der unsicheren Valin- und Isoleucinwerte nach 200- und 400-stündiger Hydrolyse wurde der Fehler, bedingt durch unvollständige Hydrolyse, weitgehend eingeschränkt.
Die Bestätigung der aufgestellten Summenformel für die Peptidkette der Hüllproteinuntereinheit des Phagen fd gelang mit Hilfe der HCl-Peptide, die sich alle in die ermittelte Partialformel und letztlich in die vorliegende Sequenz einordnen lassen. Es wurde kein Peptid gefunden, das nicht in diese Formel paßt.
Eine weitere Bestätigung des Ergebnisses stellt die Molekulargewichtsbestimmung durch Hydrazinolyse dar.
Die größten Fehlermöglichkeiten treten beim Edman-Abbau auf. Hier sind Fehlinterpretationen bei der Identifizierung der

schrittweise abgespaltenen PTH-Aminosäuren nicht auszuschließen, die eine Folge von Zersetzungsreaktionen während des Abbaus oder von in mehreren Chromatographiesystemen gleichen Rf-Werten für zwei verschiedene Reste sind. Die Deutung wird besonders schwierig, wenn es sich um eine Häufung gleicher Aminosäuren handelt. Eine einfache Bestätigung erfährt die durch Edman-Abbau ermittelte Sequenz eines Peptids dann, wenn nach völligem Abbau alle Aminosäuren wiedergefunden wurden, aus denen dieser Teilbereich besteht.
Zusammen mit den Ergebnissen aus mehreren Spaltungen, die für jede Spaltstelle der HCl-Spaltung mehrere Überlappungspeptide liefern, und dem Edman-Abbau von Peptiden liegen genügend Informationen zum Beweis der Sequenz der fd-Hüllproteinuntereinheit vor. Eine zusätzliche Sicherung der auf diese Weise ermittelten Aminosäurereihenfolge ist durch die große Zahl von rein isolierten und in ihrer Aminosäurezusammensetzung bestimmten Peptiden aus der Salzsäurespaltung gegeben. Allein mit Hilfe der Ergebnisse aus dieser Spaltung läßt sich jeder Bereich der Partialformel und zum Teil auch der Primärstruktur mehrfach belegen. Die gesamten Informationen aus allen durchgeführten Spaltungen sind miteinander vereinbar und lassen sich widerspruchslos zuordnen.

B. Betrachtung zum Ergebnis

Bei der Betrachtung der Primärstruktur der Hüllproteinuntereinheit fällt sofort auf, daß die polaren Reste hauptsächlich an den beiden Enden der Kette zu finden sind. Entsprechend dieser Verteilung läßt sich eine Dreiteilung dieser Peptidkette vornehmen, die unmittelbar die Eigenschaften dieses Proteins veranschaulicht (Tafel 2).
Der N-terminale Bereich von Position 1 - 20 enthält alle sauren Aminosäuren der Kette und nur einen basischen Rest. Dieses stark hydrophile Ende dürfte für die Löslichkeit des Phagen in wässrigen Systemen und dessen niedrigen isoelektrischen Punkt von pH 3,9 verantwortlich sein.

Das Mittelstück von Position 21 - 34 ist hydrophob und enthält alle Valinreste der Kette. Die nur einmal pro Untereinheit auftretenden Reste Methionin und Tryptophan sind benachbart und befinden sich zusammen mit den beiden Tyrosinresten in diesem stark aggregierenden Sequenzbereich. Das HCl-Corepeptid C II zeigt eine so hohe Aggregationstendenz, daß es mit der Front von Sephadex G 50 eluiert wird. Ein solches Verhalten entspricht einem Molekulargewicht von mehr als 10000, infolge der Aggregation von etwa 8 Molekülen C II, das 14 Reste enthält, in dem verwendeten Lösungsmittelsystem. Dieser Mittelbereich stabilisiert wahrscheinlich das aus etwa 2000 Untereinheiten zusammengesetzte Hüllprotein.



Tafel 2: Die Dreiteilung der Peptidkette (Hüllproteinuntereinheit des Bakteriophagen fd) - ein morphopoetisch "trifunktionelles" Protein.

Der basische C-terminale Bereich von Position 35 - 49 ist wiederum hydrophil. Vier der fünf Lysinreste der Kette befinden sich in diesem Teil, der wahrscheinlich mit den Phosphatgruppen der ringförmigen einsträngigen DNS des stäbchenförmigen Phagen fd in Wechselwirkung tritt und die negativen Ladungen neutralisiert. Gleichzeitig stabi-

lisieren wahrscheinlich die dabei auftretenden Coulomb-Kräfte die Quartärnärstruktur des Hüllproteins. Diese Hypothese wird durch den experimentellen Befund gestützt, daß Carboxypeptidase A den nativen Phagen nicht angreift.

Die Hüllproteinuntereinheit des Phagen fd ist somit ein "trifunktionelles" Molekül mit löslichkeitsvermittelnden, aggregierenden und negative Ladungen neutralisierenden Eigenschaften. Diese drei Aufgaben werden von einer aus nur 49 Aminosäuren bestehenden Polypeptidkette erfüllt. Ein Aminosäureaustausch in einem so kleinen Protein sollte sehr leicht zu einem Funktionsausfall führen und als letale Mutation unentdeckt bleiben. Die große Ähnlichkeit der Hüllproteine der verschiedenen kleinen DNS-haltigen stäbchenförmigen E.-coli-Phagen ist ein Beweis dafür, daß diese Primärstruktur durch Mutationen nur sehr geringfügig verändert werden darf. Ein Aminosäureaustausch ist am ehesten im N-terminalen Bereich denkbar, der sicher an keiner Protein-Protein-Wechselwirkung oder Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung beteiligt ist.
Der für die Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung verantwortliche C-Terminus hat eine auffallend ähnliche C-terminale Sequenz wie das Tabakmosaikvirus (TMV) (52). Beide Viren gehören zwar verschiedenen Gruppen an, TMV ist ein RNS-Virus und fd ein DNS-Phage, sind jedoch stäbchenförmig und bilden aus der gleichen Anzahl von 2000 Untereinheiten ihr Hüllprotein. Die Untereinheit von fd ist jedoch nur ein Drittel so groß wie die vom TMV.

Virus	C-terminale Sequenz
Phage fd	Phe-Thr-Ser-Lys- -Ala-Ser-COOH 44 49
TMV-vulgare	Try-Thr-Ser-Gly-Pro-Ala-Thr-COOH 152 158
TMV-Dahlemense	Try-Thr-Ser-Ala-Pro-Ala-Ser-COOH 152 158

Die Sequenzlücke nach Braunitzer im C-terminalen Bereich (53) ermöglicht ein leichteres Erkennen der großen Ähnlichkeit der verglichenen Bereiche.

Diese charakteristische Sequenz der stäbchenförmigen Viren scheint unmittelbar mit der dreidimensionalen Struktur des Hüllprotein-Nukleinsäurekomplexes in Zusammenhang zu stehen.

Das mit der Ultrazentrifuge bestimmte zu große Molekulargewicht von 10000 für die Untereinheit (17) wird erklärt, wenn man eine Dimerisierung von Ketten in der Weise annimmt, daß eine maximale Ladungsabsättigung eintritt. Marvin (pers. Mitteilung) nimmt für die Polypeptidkette eine S-förmige Konformation an. Beim aggregierten Protein zeigt somit ein Teil in Richtung DNS, der andere Teil ragt in die wässrige Phase. Der Mittelbalken ist, wie schon erwähnt, für die Aggregation verantwortlich. Nach den Vorstellungen Marvins (54) über die Quartär-Struktur windet sich um den auf- und absteigenden Teil der ringförmigen Phagen-DNS eine Hüllproteinspirale. Es wird eine Art Doppelrohr angenommen, das von einem oder zwei verschiedenen Kapsel- oder Deckel-Proteinen abgeschlossen wird (8). Diese Minorproteine spielen bei der Infektion der Wirtszelle mit Phagen der fd-Gruppe eine große Rolle und sind wahrscheinlich auch für die Stabilität der Proteinhülle von entscheidender Bedeutung (8). Es ist zu hoffen, daß die Struktur dieser "Deckel-Proteine" bald untersucht wird.

Die vorliegende Sequenz der Hüllproteinuntereinheit des fd-Phagen macht auch das abnormale Verhalten dieses Proteins in der ORD und bei Denaturierungsversuchen verständlich. Die hydrophilen Enden der Kette, die etwa 75% der Gesamtstruktur ausmachen, sind sehr leicht durch wasserstoffbrükkensprengende Lösungsmittel in ihrer Sekundärstruktur zu beeinflussen. Es wird auch ein Anteil von 25% gefunden, der mit diesen Lösungsmitteln nicht in seiner Sekundärstruktur verändert wird. Es handelt sich um den ausgedehnten hydrophoben Bereich, der in Gegenwart von lipophilen Lösungsmitteln destabilisiert und damit denaturiert werden konnte.

Das völlige Verschwinden des großen negativen Cotton-Effekts bei 233 nm succinylierter und maleinierter Hüllproteinderivate bedeutet, daß es sich hier um denaturiertes Protein handelt. Da aber nur die terminalen Bereiche durch Einführung dieser polaren Gruppen destabilisiert werden, ist anzunehmen, daß die Stabilität des hydrophoben Bereichs auf Grund intramolekularer und intermolekularer hydrophober Bindungen zustandekommt. Bei den chemisch modifizierten Derivaten können sich keine intermolekularen hydrophoben Bindungen mehr bilden, da auf Grund sterischer Hinderung und Abstoßung gleicher negativer Ladungen eine Annäherung zweier Ketten erschwert wird. Succinyliertes Hüllprotein aggregiert nicht mehr und ist im Gegensatz zum nativen Protein dialysabel. Das Hüllprotein des Bakteriophagen fd wird aus Untereinheiten gebildet, die ein in der Proteinchemie überraschend kleines Molekulargewicht von 5169 aufweisen. Damit ist diese Kette, abgesehen von den Peptidhormonen, der kleinste bisher bekannte Eiweißstoff mit einer bekannten Funktion. Nach der gelungenen Synthese der Peptidhormone ACTH, Glucacon und Thyrocalcitonin (55) sollte einer Synthese der Hüllproteinuntereinheit des fd-Phagen nichts mehr im Wege stehen. Eine erfolgreiche Rekonstitution aus synthetischem Protein und aus Phagen isolierter DNS würde dieses Virus zu einem Modellsystem machen, an dem die Wechselwirkung zwischen Protein und DNS untersucht werden kann.

Experimenteller Teil

I. Phagenaufzucht, Reinigung und Isolierung des Hüllproteins

A. Darstellung des Phagen und des Hüllproteins

1. Aufzucht und Reinigung

Die Standard-Aufzucht wurde in 20 l Zuchtflaschen mit 15 l sterilisiertem Medium durchgeführt. Für ein Liter Medium wurden 15 g filtriertes Bactotrypton, 30 ml Glycerin, 2,1 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$, 0,9 g KH_2PO_4, 1,0 g NH_4Cl in 1000 ml dest. Wasser gelöst und 45 min autoklaviert. Aus jeweils getrennt sterilisierten Vorratslösungen wurden zur Vervollständigung des Mediums zugegeben: 0,3 ml 1 m $CaCl_2$, 1,5 ml 20%-$MgSO_4\ 7\ H_2O$ (0,3 g), 1 ml 0,1%-$FeSO_4\ 7\ H_2O$ (1 mg), 1 ml 1%-Gelatine (10 mg). Das Medium (15 Liter-Ansatz) wurde mit 100 ml einer Übernachtkultur von E. coli K_{12} (λ^-) Hfr 3300 oder E. coli K_{12} (λ^-) Hfr Cavalli beimpft. Die Bakterien wurden bei 37° C (bei niederen Temperaturen werden keine F-pili gebildet) und Luftzufuhr bis zu einer Zellzahl von 2 bis $5 \cdot 10^8$/ml gezogen und dann mit der 10-fachen Menge an Bakteriophagen angeimpft. Die Bakterien wurden vor der Phageninfektion auf Freiheit von Phagen geprüft (einfacher Tüpfeltest auf einer Agar-Platte). 6 Stunden nach dem Animpfen mit Phagen wurde im allgemeinen ein Phagentiter von 1 bis $2 \cdot 10^{13}$/ml mit dem Plaque-Test nach Adams (18) erreicht.

Die Abtrennung der Phagen von den Bakterien erfolgte in der Padberg-Durchlaufzentrifuge. Im klaren Überstand befanden sich die Phagen. Das Bakteriensediment wurde verworfen. Durch Alkoholfällung bei pH 3,9 (10% Äthanol)und Abhebern der Flüssigkeit wurde das phagenhaltige Proteinmaterial von der Rohlösung getrennt. Dieses Material wurde mit halb gesättigter Boratlösung von pH 8,6 auf pH 7,5 titriert, über Nachtdialysiert und von Lipoiden durch Frigen[+)]-Extraktion befreit. Abschließend

---

+) Frigen = Difluor-dichlor-äthylen

waren zur Reinigung und Konzentrierung noch zwei Zentrifugationen erforderlich: Eine Vorzentrifugation in eine Zukkerlösung (2,5 ml 80%-Glucoselösung überschichtet mit der Phagensuspension) 6 Stunden bei 30000 Upm.
Ausbeute: 60 mg/1000 ml Medium.
Für Aminosäurenanalysen und Hydrazinolysen wurde das Phagenmaterial in der trägerfreien Elektrophorese bei pH 8,3 und 5,3 nachgereinigt. Für die Elektrophorese bei pH 8,3 fand ein Boratpuffer aus 381,42 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$/12 ltr H_2O, eingestellt mit konz. Eisessig, in der Verdünnung 4 zu 6 Verwendung. Der Natriumacetat-Puffer für die präparative Elektrophorese bei pH 5,3 aus 337,5 g $NaOAc \cdot 3\ H_2O$/25 ltr H_2O, eingestellt mit Eisessig, wurde im Verhältnis 2,5 zu 7,5 verdünnt.
Eingesetzt wurden 80 mg lyophilisierter Phage für die erste Elektrophorese bei pH 8,3. Nach Druckdialyse erfolgte die zweite Elektrophorese bei pH 5,3.
Ausbeute: 16 mg (20%).
Das hochgereinigte Phagenpräparat wurde anschließend zur Entfernung der Puffersalze gegen Wasser dialysiert.

2. Herstellung eines DNS-freien Hüllproteins
Phenolextraktion:
Durch zweimaliges Ausschütteln von 50 mg Phage in 50 ml 1/75 m Boratpuffer pH 8,2 mit puffergesättigtem Phenol (Phenol wurde mit 1/75 m Boratpuffer pH 8,2 gesättigt) im Verhältnis 1 : 1 bei 4° C wurde das Protein abgetrennt, das in die Phenolunterphase geht. Die Trennung der Phasen erfolgte durch Zentrifugation in der Servall-Zentrifuge (5 min, 12000 Upm). Nach dem Abziehen der Oberphase wurde die Phenolphase mit Eisessig und Boratpuffer im Verhältnis 1:1:1 versetzt und gegen Essigsäure (30%ige, anschließend 15%ige), Boratpuffer und dest. Wasser in der angegebenen Reihenfolge dialysiert.
Ausbeute: 23 mg = 46%

Spaltung mit DNase:
100 mg fd Phage wurden 90 min bei 4° C mit 10 ml Ameisensäure denaturiert. Die Lösung wurde nur leicht rosa, während längere Zeiten und Denaturierungen bei höheren Temperaturen eine tief violette Färbung zeigten. Nach Gefriertrocknung zur Entfernung der Ameisensäure wurde in 10 ml TMA-Puffer pH 7,3 (0,001 m Mercaptoäthanol, 0,01 m Tris, 0,01 m MgOAc, 0,022 m NH_4Cl und 0,00025 m EDTA) das denaturierte Material suspendiert und 60 sec mit Ultraschall bestrahlt (Resonanzstrahlung). Nach Zugabe von 0,5 mg DNase in 0,5 ml TMA-Puffer, wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch abgefüllt und gegen TMA-Puffer dialysiert. Das Protein im Dialyseschlauch konnte nach Beendigung der Reaktion (15 h) und Dialyse gegen Wasser direkt gefriergetrocknet werden.
Ausbeute: 92 mg (92%).

B. Quantitative Bestimmung der C-terminalen Aminosäure durch Hydrazinolyse

Je 3 mg lyophilisierter fd-Phage (Material in der trägerfreien Elektrophorese gereinigt) wurden 90 Stunden bei 60° C in der Trockenpistole entwässert. Zusammen mit 20 mg IRC-50 in der H-Form und 2 ml wasserfreiem Hydrazin wurde das trockene Proteinpräparat in einem leicht schmelzbaren Reagenzglas unter Vakuum eingeschmolzen. Die Hydrazinolysen wurden bei 80°C in einem Hydrolyseofen durchgeführt. Anschließend wurden die Proben im Exsikkator über konz. Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand wurde in 1 ml Analysatorpuffer pH 2,2 (Citronat) aufgenommen, das IRC-50 abzentrifugiert, mit Puffer 2 x nachgewaschen und nach dem Einstellen der Probe auf pH 2,2 mit 1 n HCl direkt die freie Aminosäure auf dem Analysator bestimmt. Die Analyse ergab nur Serin.
Eine gleichzeitig durchgeführte Aminosäureanalyse von 3 mg hydrolysiertem fd-Phagen ergab einen Proteingehalt von 2/3=2 mg bezogen auf eine Einwaage von 3 mg. Dieser Wert wurde folgendermaßen berechnet: 3 mg fd-Phagen zeigten nach Totalhydrolyse

und quantitativer Bestimmung der Aminosäuren ein kleinstes gemeinschaftliches Vielfaches von $0{,}40 \cdot 10^{-3}$ Mol bezogen auf 50 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht der Kette von 5000 und von $0{,}20 \cdot 10^{-3}$ Mol bezogen auf 100 Aminosäuren entsprechend einem Molekulargewicht von 10000. Daraus ergab sich, daß die berechneten Molzahlen für eine Aminosäure nur sinnvoll sind, wenn der Proteinanteil der Einwaage 2 mg betrug. Aus dem aus 9 verschiedenen Hydrazinolysen extrapolierten Serinwert von $0{,}34 \cdot 10^{-3}$ Mol und der reduzierten Einwaage von 2 mg Hüllprotein wurde ein Molekulargewicht von 5900 errechnet. Eine Korrektur der Serinwerte der bei der Hydrazinolyse zerstörten Serinreste wurde nicht berücksichtigt.

C. Optische Bestimmungen

1. ORD

Die Messungen der optischen Rotationsdispersion wurden in der Abteilung Engel, Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit dem Cary 60 durchgeführt. Die verwendeten Meßzellen waren thermostatisierbar und hatten eine Schichtdicke von 1 cm, 0,1 cm und 0,01 cm. Die Proteinkonzentration der vermessenen Proben wurde auf dem Aminosäureanalysator nach Totalhydrolyse der einzelnen Proben bestimmt und auf 1 Prolinrest pro Polypeptidkette berechnet.

2. Bestimmung des Tryptophan-Tyrosin-Verhältnisses

DNA-freies fd-Protein (0,25 mg/ml) wurde im Zeiss Spektrophotometer im UV in 0,1 n NaOH vermessen. Die Extinktionen bei 294 nm und 280 nm wurden bestimmt und in die Gleichung von Beaven und Holiday eingesetzt:

$$\frac{M_{Tyr}}{M_{Try}} = \frac{0{,}592\ E_{294} - 0{,}263\ E_{280}}{0{,}263\ E_{280} - 0{,}170\ E_{294}} = \frac{0{,}18}{0{,}11} \qquad \begin{matrix} E_{294} = 0{,}70 \\ E_{280} = 0{,}88 \end{matrix}$$

II. Reaktionen am Hüllprotein

A. Acylierung reaktiver Gruppen mit bekannten Acylierungsmitteln

1. Die Umsetzung mit S-Äthyl-thio-trifluoracetat (Trifluoracetylierung)

50 mg fd-Phage wurden in 10 ml 8 m Harnstoff gelöst und mit 1 n KOH auf pH 9,5 titriert. Die Acetylierung im pH-Stat bei Raumtemperatur, Titration mit 1 n KOH zur Aufrechterhaltung von pH 9,5, erfolgte durch tropfenweise Zugabe von 0,25 ml Trifluoressigsäurethioäthylester ($1{,}2 \cdot 10^{-3}$ Mol = 24-facher Überschuß). Nachdem keine Lauge mehr verbraucht wurde, läßt man 1 Std. nachreagieren und entfernt die Salze durch Chromatographie über Sephadex G 25 oder durch Dialyse.
Ausbeute: 30 mg (60%) TFA-Protein (TFA = Trifluoracetylgruppe).
Ausbeutebestimmung der Trifluoracetylierungsreaktion:
5 mg TFA-Protein in 2,5 ml 1%iger Na HCO_3-Lösung wurden 2 Stunden mit 0,5 ml einer 5%igen alkoholischen FDNP-Lösung (120 µMol) geschüttelt. Überschüssiges FDNP und gebildetes Dinitroanilin wurden durch zweimaliges Ausschütteln mit Essigsäureäthylester entfernt. Nach Sephadex G 25-Chromatographie zur Entfernung der Salze wurde das DNP-Protein mit 6 n HCl 20 Std. totalhydrolisiert und auf dem Analysator vermessen. Bezogen auf Asp und Glu wurden 80%, (4 an Stelle von 5), nicht mit DNP umgesetzte Lysinreste gefunden.
Die Trifluoracetylierung erfolgte mit einer Ausbeute von 80% (bezogen auf alle trifluoracetylierbaren Lysinreste).
Abspaltung der TFA-Gruppe:
Die TFA-Gruppe konnte von der N-terminalen Aminogruppe und den ε-Aminogruppen der Lysinreste quantitativ mit 0,5 m Ammoniak abgespalten werden.
5 mg TFA-Protein wurden 4 Std. bei Raumtemperatur in 5 ml 0,5 m NH_3 hydrolisiert. Nach Umsetzung mit FDNP (s.o.) wurde

nach Totalhydrolyse mit 6 n HCl (20 h) kein freies Lysin mehr gefunden, was einer völligen Abspaltung der TFA-Gruppen entspricht.
Abspaltungsausbeute: 100%

2. Succinylierung und Maleinierung
200 mg Phage wurden in 50 ml 10 m Harnstoff bei 37° C gelöst und mit 1 n NaOH auf pH 8,0 titriert. Während der allmählichen Zugabe von 1,04 g Bernsteinsäureanhydrid (1,02 g Maleinsäureanhydrid) ($10,4 \cdot 10^{-3}$ Mol entsprechend einem 20-fachen Überschuß bezogen auf die reaktiven Gruppen) wurde mit dem Autotitrator mit 5 n KOH pH 8,0 konstant gehalten.

Das Volumen wurde auf 5 ml im Rotationsverdampfer eingeengt und die Lösung über Sephadex G 25 entsalzt.
Ausbeute: 194 mg succinylierter Phage.
Die Acylierungsausbeute wurde wie oben durch Umsetzung der nicht acylierten freien Aminogruppen mit FDNP und anschliessende Bestimmung der freien Lysinreste nach Totalhydrolyse mit 6 n HCl (20 h) ermittelt.
Acylierungsausbeute: 95%
Abspaltung der Maleinsäuregruppe:
Die Succinylgruppe läßt sich nur unter den Bedingungen der Totalhydrolyse mit 6 n HCl entfernen. Die Abspaltung der Maleinsäuregruppe gelingt dagegen verhältnismäßig leicht bei pH 2,5.
Die Abspaltungshydrolyse wurde in 0,1 m Pyridin/Acetat-Puffer pH 2,5 12 Std. bei 37° C an Peptiden aus einer Thermolysinspaltung von 5 mg maleinierten Proteins durchgeführt. Im Diagonalfingerprint traten nach der Entfernung der Maleinsäuregruppen an Stelle von 6 sauren Peptiden 3 neue neutrale Peptide und 4 neue basische Peptide auf (s.S. 41).

B. Acylierung mit Tetrafluorbernsteinsäureanhydrid (TFBA)[+)]

100 mg fd-Phage wurden in 10 ml 10 m Harnstoff gelöst. Durch Zugabe von 4,5 ml H_2O wurde die Lösung auf 7 m Harnstoff ver-

+) Auszugsweise veröffentlicht: G. Braunitzer, K. Beyreuther, H. Fujiki u. B. Schrank; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 265 (1968)

dünnt und mit K_2HPO_4, KH_2PO_4 (je 1,4 g = 1 m PO_4-Puffer) im Bereich um pH 7 gepuffert.
Die Umsetzung erfolgte bei 0° C und pH 7,5 (mit 1 n NaOH aus dem Autotitrator konstant gehalten) durch Zutropfen von 1,5 ml TFBA ($11,6 \cdot 10^{-3}$ Mol = 50-facher Überschuß). Nach 90 min war die Reaktion beendet. Die Reinigung des Derivats erfolgte über Sephadex G 25 (0,01 m Phosphatpuffer, pH 6,5).
Abspaltung der TFB-Gruppe:
Eine Abspaltung der TFB-Gruppe gelang sowohl mit 0,1 m Pyridin-Acetat-Puffer pH 2,5 wie auch mit 0,5 m NH_3 bei 20° C. Der Nachweis erfolgte auf gleiche Weise, wie für die Maleinsäureabspaltung beschrieben wurde (s.o.).

III. Spaltungen des Hüllproteins

A. Enzymatische Spaltungen

1. Spaltung mit Trypsin

Das verwendete Trypsin wurde zur Beseitigung chymotryptischer Restaktivitäten mit TPCK[+)] behandelt.
Zwei Spaltungsmethoden wurden angewandt:
Spaltung von TFA-Protein in 0,5 m Ammoniak und Spaltung von in konzentriertem Ammoniak denaturiertem Phagen in 1 m NH_4HCO_3-Lösung.
200 mg TFA-Protein wurden bei 0° C in 100 ml 0,5 m NH_3 mit 5% Trypsin 10 Std. gespalten. 1% Enzym wurde alle 60 min zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und lyophilisiert. 140 mg = 70% blieben unlösliches Material. Der lösliche Anteil wurde über Dowex 1 x 2 chromatographiert.
200 mg fd-Phage (f1-Phage) wurden 30 min in 10 ml konz. NH_3 denaturiert. Nach Verdünnung auf 150 ml (1 m NH_3) wurde so lange CO_2 eingeleitet, bis die Lösung pH 9,0 zeigte und mit 5% Trypsin (w/w) 12 Std. bei 20° C gespalten. Der unlösliche Anteil wurde abzentrifugiert. Der lösliche Anteil wurde lyophilisiert und über Dowex 1 x 2 chromatographiert.

+) L-(1-Tosylamido-2-phenyl-äthyl-chloromethylketon)

2. Spaltung mit Thermolysin

200 mg fd_{succ} oder fd_{mal} (fl_{succ} oder fl_{mal}) wurden in 25 ml H_2O gelöst und bei 37° C mit 3,0 mg Thermolysin (1,5%), gelöst in 0,25 ml 0,001 m $CaCl_2$, 0,05 m Tris-Puffer pH 8,0, versetzt. Mit n/10 NaOH aus dem Autotitrator wurde auf pH 8,0 titriert und 4 Std. hydrolisiert. Die Spaltung wurde durch Zugabe von Eisessig (pH 3,5) oder sofortige Gefriertrocknung beendet. Da nur lösliche Spaltprodukte vorlagen, konnte danach direkt die Vortrennung über Sephadex G 25 angeschlossen werden.

3. Spaltung mit Pepsin

200 mg fd-Phage (fl-Phage) wurden in 10 ml konz. Ameisensäure 1 Std. bei 20° C denaturiert. Anschließend wurde diese Lösung in 90 ml H_2O, die 6 mg Pepsin (3%) enthielt, eingerührt. Nach 12 Std. bei 20° C wurde vom unlöslichen Anteil, der etwa 60% betrug, abzentrifugiert, der lösliche Teil einrotiert und über Dowex 1 x 2 chromatographiert.

B. Salzsäurespaltung

1000 mg fd-Phage (176 µMol Protein) wurden in 50 ml 12 n HCl (D_{20} 1,186, Riedel-DeHaen-AG) 32 Std. in einem 250 ml Rundkolben bei 20° C gespalten. Die Lösung wurde anschließend im Rotationsverdampfer kalt einrotiert und in 50 ml H_2O suspendiert. Der unlösliche Anteil wurde abzentrifugiert (etwa 45%), 2 x mit 10 ml Wasser nachgewaschen und in 25 ml 12 n HCl bei 20° C 48 Std. nachgespalten. Die Nachspaltung wurde einrotiert und bei pH 9,5 und pH 2,2 vom löslichen Anteil durch Extraktion und Zentrifugation getrennt. Der unlösliche Anteil wurde aus Ameisensäure lyophilisiert und betrug etwa 10% des eingesetzten Proteins. Die löslichen Anteile wurden über Dowex 1 x 2 vorgetrennt. Der unlösliche Teil wurde nach der 32-stündigen Spaltung und nach der Nachspaltung über Sephadex G 50 gereinigt.

IV. Reinigungsmethoden für Peptide

A. Angewandte Methoden

Die Reinigung von Peptidgemischen aus den Spaltungen wurde durch Ionenaustauscherchromatographie, Verteilungschromatographie mit Sephadex Dextranen und auf Papier durchgeführt. Bei den säulenchromatographischen Methoden hängt ein guter Trenneffekt sehr stark von einer gleichmäßigen Durchströmung der Säulen ab. Das wird erreicht durch ein entsprechendes Füllverfahren. Die Säulen werden mit Äquilibrierpuffer gefüllt und unter ständigem Ausfließen des Puffers allmählich dieser durch eine Suspension des Austauschers ersetzt. Der Austauscher liegt sehr verdünnt vor und wurde in den meisten Fällen zusammen mit dem Puffer entlüftet, nachdem er genügend lange äquilibrieren konnte.
Nach dem Füllen wurde mit einer Peristaltik-Schlauchpumpe die Fließgeschwindigkeit des Äquilibrierpuffers so gewählt, daß ein leichter Überdruck in der Säule entsteht zur Vermeidung von Luftblasen im Säulenbett.
Die Gradienten wurden in geschlossenen Mischgefäßen linear bereitet. Die einzelnen Puffer wurden nacheinander an das gleiche Mischgefäß angeschlossen, wobei eine Schaltuhr mit einem Dreiwegehahn den Pufferwechsel automatisch durchführte.
Die Fraktionierung wurde mit einem der üblichen Fraktionssammler durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden entweder im UV bei 280 nm mit einem Photometer oder mit der Ninhydrinreaktion nach alkalischer Hydrolyse ausgewertet. Für diese Farbreaktion wurde ein Aliquot jeder Fraktion (0,05 - 0,2 ml) mit 1 ml 2,5 n NaOH 3 Std. bei 120° C hydrolisiert. Nach Neutralisation mit 1 ml 20%iger Essigsäure, Zugabe von 1 ml Ninhydrinreagenz nach Stein und Moore wurde 15 min auf 100° C erhitzt und nach Abkühlen der blaue Farbstoff mit 5 ml 50%igem Äthanol verdünnt. Die Stärke der Färbung wurde im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen und durch einen Schreiber registriert.

B. Ionenaustauscherchromatographien

1. Anionenaustauscher Dowex 1 x 2

Dowex 1 x 2, 200 - 400 mesh, wurde in der Acetatform verwendet. Dazu wurde neuer Austauscher in der Chloridform oder gebrauchter in der Acetatform mit Verunreinigungen durch Waschen mit 2 n Natronlauge, Nachspülen mit dest. Wasser, bis zur Neutralreaktion des Waschwassers, in die Hydroxylform übergeführt. Das Eluat wurde auf Chlorid mit einer Silbernitratlösung geprüft. Wenn sich nur eine opalisierende Lösung ergab und nach 10 min sich kein Niederschlag zusammengeballt hatte, wurde mit Eisessig in die Acetatform übergeführt. Nachdem mit dest. Wasser neutral gewaschen wurde, kann der Austauscher im Äquilibrierpuffer aufgeschlämmt und zur Füllung der Säulen verwendet werden. Endgültig äquilibriert wurde in der Säule und zwar bis das pH des Eluats dem des Äquilibrierpuffers auf 0,05 Einheiten angeglichen war.

In allen Läufen wurden Standardsäulen von 50 cm Länge und 2 cm Durchmesser oder 25 cm Länge mit 1,5 cm Durchmesser benutzt, die auf 40° C temperiert wurden. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 30 ml pro Std. entsprechend 6 Fraktionen zu 5 ml. Die Mischgefäße enthielten 350 bzw. 150 ml Äquilibrierpuffer.

An die Mischgefäße wurden folgende entlüftete Puffer angelegt, die mit Eisessig auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt wurden:

1.) Äquilibrierpuffer pH 8,5
    2% 2,4,6 Collidin, 2% 2,4 Lutidin und 2% α-Picolin
2.) Puffer pH 6,7 ab Fraktion 40
    3% 2,4 Lutidin, 3% α-Picolin und 4% Pyridin
3.) Puffer pH 5,5 ab Fraktion 80
    3% 2,4 Lutidin, 3% α-Picolin und 4% Pyridin
4.) Puffer pH 4,8 ab Fraktion 145
    5% α-Picolin und 5% Pyridin

5.) Puffer pH 4,0 ab Fraktion 190
5% α-Picolin und 5% Pyridin
6.) Eisessig ab Fraktion 235
Die Substanz wurde mit einem pH-Wert von 9,0 - 9,5 aufgetragen. Das Auftragvolumen betrug 10 - 30 ml.

2. Kationenaustauscherchromatographie
Rechromatographien wurden über Phosphorcellulose- und Dowex-50-Austauscher durchgeführt.
Phosphorylierte Zellulose der Firma Whatman wurde nach Quellung durch Wasser von schwebenden Partikeln durch Dekantieren vom schnell sedimentierenden Hauptanteil getrennt. Durch dreimaliges Waschen mit 0,5 n HCl wurde in die H^+-Form übergeführt. Nach Neutralwaschen mit dest. Wasser wurde der Austauscher in der fünffachen Menge Äquilibrierpuffer suspendiert und wiederum solange dekantiert, bis der Überstand klar blieb. Gefüllte Säulen wurden mehrfach verwendet und nach jedem Lauf äquilibriert.
Dowex 50 x 2, 200 - 400 mesh, wurde je zweimal mit 2 n Salzsäure und 2 n Natronlauge behandelt. Zwischen den einzelnen Waschungen wurde überschüssige Lauge oder Säure mit dest. Wasser ausgewaschen, damit keine zu große Neutralisationswärme entstand. Da zum Schluß mit Natronlauge gewaschen wurde, liegt der Austauscher in der Na^+-Form vor und wird nach dem Neutralwaschen mit Äquilibrierungspuffer aufgeschlämmt. Dowex-50-Säulen wurden bei 50° C gefüllt, äquilibriert und gefahren. Da das Harzbett in der Säule mit steigender Ionenstärke schrumpft, konnten Dowex-50-Säulen nur einmal verwendet werden, da beim Äquilibriervorgang die Säulenfüllung Risse aufwies. Die für die Chromatographie mit Phosphor-Zellulose verwendeten Säulen waren in der Regel 25 cm lang und 1 - 1,5 cm weit. Die Dowex-50-Säulen waren 15 - 20 cm lang und 1 cm weit.

Zur Elution wurden Pyridin-Formiat-Puffer gewählt. Die Mischgefäße enthielten in der Regel 100 ml Puffer. Die Elutionspuffer wurden für den pH-Bereich besonders flach gelegt, bei dem die Peptide erwartungsgemäß eluiert werden sollten. Dieser Bereich ließ sich aus dem Dowex-1-Läufen abschätzen.

Verwendete Puffer:

1.) Äquilibrierungspuffer pH 3,0
    0,1 n Pyridin-Formiat
2.) Puffer pH 3,2 ab Fraktion 40
    0,5 n Pyridin-Formiat
3.) Puffer pH 3,45 ab Fraktion 80
    1,0 n Pyridin-Formiat
4.) Puffer pH 3,7 ab Fraktion 120
    2,0 n Pyridin-Formiat
5.) Puffer pH 4,4 ab Fraktion 160
    2,5 n Pyridin-Formiat

Die Substanz wurde jeweils bei pH 2,2 aufgetragen. Das Auftragvolumen variierte von 5 - 20 ml.

C. Chromatographie über Sephadex

Sephadex G 25 und G 50 wurde über Nacht mit dem Chromatographie-Puffer (meist Ammoniumbicarbonat-Puffer) äquilibriert und in einem Meßzylinder mehrmals von schwebenden Partikeln durch Abgießen befreit. Die gefüllten Säulen wurden mit Cytochrom C oder Dextran-Blau auf ihre Trennfähigkeit geprüft.
Im allgemeinen wurden Pharmacia-Säulen mit einer Länge von 38 cm und einem Durchmesser von 2,8 cm benutzt. Für diese Säulen wirkte sich ein Auftragvolumen von 1,5 - 3 ml besonders vorteilhaft auf den Trenneffekt aus.

D. Papierelution

Da durch Säulenchromatographien über die verschiedenen Austauscher nicht alle Peptide rein erhalten werden konnten, wurde als letzter Reinigungsschritt die präparative Papierchromatographie gewählt. 0,5 bis 1,0 µMol Peptidgemisch wurden auf einen Papierbogen, 60 x 60 cm (Whatman Nr. 2), 10 cm vom Rand punktförmig im Abstand von je 1 cm aufgetragen und

im System von Baglioni[+)] oder Partridge[++)] chromatographiert. Nachdem die Wanderungsweite der einzelnen Peptide durch Anfärben der Ränder mit Ninhydrin ermittelt wurden, konnten die Peptide von den ausgeschnittenen Streifen mit 20%iger Essigsäure bzw. 10%iger Pyridinlösung eluiert werden.

V. Sequenzbestimmung am HP und an Peptiden

A. Edman-Abbau

Bestimmung des N-Terminus durch Edman-Abbau:
5 mg Phage oder 0,5 µMol Core-Peptid II (CIII) wurden in 0,4 ml konz. Ameisensäure gelöst und auf 4 Papierstreifen (60 x 10 mm) gleichmäßig verteilt aufgetragen. Die löslichen Peptide (0,5 µMol) wurden in 0,4 ml Wasser auf die 4 Streifen aufgetragen. Die Salze und die Ameisensäure wurden durch dreimalige Extraktion (mit je 7 ml Benzol und nach Trocknung mit je 7 ml Aceton) entfernt. Anschließend wurde noch einmal mit Benzol nachgewaschen und über Nacht bei 40° C die Streifen getrocknet. Auf die Streifen wurden 0,07 ml einer 20%igen Lösung von Phenylsenföl (Phenylisothiocyanat) in Dioxan aufgetragen und in ein geschlossenes System mit Dioxan, Pyridin, Wasser (1:1:1) 2 1/2 Std. bei 40° C gehängt. Nach dieser Anlagerung wurde 3 mal mit Benzol gewaschen (7 ml pro Streifen, je 1 Std. auf der Laborwippe) und die Papierstreifen bei 40° C 1 Std. getrocknet. Anschließend wurde die cyclisierende Umamidierung in einem Exsikkator mit Eisessig und 6 n HCl (1:1) bei 100 Torr durchgeführt. Nach 14 Std. war die Cyclisation beendet und die Streifen wurden über Nacht im KOH-Exsikkator bei 12 Torr neutralisiert. Die gebildete Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PTH-AS) wurde von den Streifen durch zweimaliges Waschen mit Aceton (p.a.) eluiert (7 ml pro Streifen und Elution) und das Aceton im Rotationsverdampfer einrotiert. Das auf den Papierstreifen verbleibende Restprotein (Restpeptid) wurde wieder von vorn diesem Cyclus unterworfen.

+) Baglioni-System: n-Butanol (i-Propanol)-Pyridin-Wasser (35:35:30)
++) Partridge-System: n-Butanol-Wasser-Eisessig (4:5:1)

Die PTH-Aminosäuren wurden durch Cochromatographie mit Referenz-PTH-AS auf Whatman Nr. 1-Papier, das mit 5%iger Stärkelösung imprägniert und luftgetrocknet war, bestimmt. Verwendet wurden die Chromatographiesysteme E (Butylacetat mit H_2O sättigen, zur Oberphase 3% Propionsäure hinzufügen und die Phase mit Formamid sättigen - verwendet wurde die Oberphase) und C (Gemisch aus 20 ml n-Heptan, 20 ml n-Butanol und 10 ml Ameisensäure - Chromatographiesystem C hat bei 30° C den besten Trenneffekt). Die bei 100° C getrockneten Chromatogramme wurden durch Besprühen mit einem Jod-Azid-Reagenz (Lösung aus: 0,5 m KJ mit 2,5 g Jod pro Liter und 0,5 m Na N_3 im Verhältnis 1:1) entwickelt. Das Papier wurde nur dort nicht gefärbt, wo Substanz vorhanden war.
Die für den Edman-Abbau verwendeten Reagentien müssen frei von Aldehyd sein. Sie wurden mit Tollens-Reagenz (ammoniakalische Silbernitratlösung) geprüft.

B. Hydrazinolyse

0,5 µMol eines Peptids wurden lyophilisiert oder im Exsikkator über KOH getrocknet. Nach 12-stündiger Trocknung über P_2O_5 bei 60° C in der Trockenpistole wurde das Peptid zusammen mit 20 mg IRC-50 (in der H^+-Form) und 2 ml wasserfreiem Hydrazin unter Stickstoff in einem leichtschmelzbaren Reagenzglas eingeschmolzen. Normalerweise reichten 40 Std. bei 80° C für eine Hydrazinolyse aus. Die weitere Aufarbeitung geschah analog der Molekulargewichtsbestimmung durch Hydrozinalyse.

C. Carboxypeptidase A

Carboxypeptidase A ist eine Exopeptidase, die sich dadurch auszeichnet, daß sie einige Aminosäuren nicht abspaltet. Das ist bei Lysin, Arginin, Prolin und Cystein der Fall. Trotz langer Inkubationszeiten werden deshalb im Gegensatz zu den Aminopolypeptiden übersichtliche Ergebnisse erzielt.
0,5 bis 1 µMol Peptid wurden in 2 ml Wasser gelöst und mit 0,1 n NaOH auf pH 8,0 titriert. Mit 0,2 mg Carboxypeptidase A, gelöst in 0,5 ml 10%-LiCl-Lösung, wurde dann 4 bis 6 Std. bei 37° C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben abgenommen und direkt auf dem Aminosäureanalysator bestimmt.

Zusammenfassung

Das Hüllprotein des kleinen stäbchenförmigen E. coli Bakteriophagen fd (Molekulargewicht $1{,}1 \times 10^7$) wurde mit chemischen und physikalischen Methoden untersucht. Enzymatische Spaltungsmethoden versagten bei der Sequenzermittlung dieses Proteins.

Durch vergleichende Messungen in der Optischen Rotationsdispersion konnte gezeigt werden, daß die außergewöhnliche Konformationsstabilität des Hüllproteins durch starke hydrophobe Wechselwirkungen verursacht wird.

Mit der partiellen Salzsäurespaltung gelang es erstmalig aus allen Bereichen der Kette Peptide zu isolieren. Die Summe der Peptide ergab eine Untereinheit des Hüllproteins, die nur halb so groß war, wie ursprünglich vermutet. Aus den 43 Peptiden der Salzsäurespaltung läßt sich eindeutig und widerspruchslos die Partialformel für die Untereinheit aufstellen, die aus nur 49 Aminosäuren besteht und der ein Molekulargewicht von 5169 entspricht. Dieser Befund konnte zusätzlich durch Hydrazinolyse bestätigt werden. Das Hüllprotein des Phagen fd ist daher - ähnlich wie beim TMV - aus etwa 2000 identischen Polypeptidketten aufgebaut. Hiermit konnte erstmalig für ein DNS-Virus das zugehörige Hüllprotein analysiert werden.

Die Untereinheit des Hüllproteins des Bakteriophagen fd ist ein "trifunktionelles" Protein. Die C-terminalen Sequenzen dieses Strukturproteins von fd und TMV zeigen eine überraschende Homologie.

Das acylierte Hüllprotein ist denaturiert und mit der Protease Thermolysin vollständig abbaubar. Im Tetrafluorbernsteinsäureanhydrid liegt ein neues Acylierungsmittel für Proteine vor, das unter milden Bedingungen wieder abgespalten werden kann.

Die Bakteriophagen f 1, M 13 und ZJ 2 zeigen in der Zusammensetzung ihrer Hüllproteine gegenüber fd nur geringe Unterschiede. Durch vergleichende Sequenzanalyse des Hüllproteins von f 1 mit fd konnte der Austausch Alanin zu Glutaminsäure für Position 7 vorgeschlagen werden.

Literaturverzeichnis

1) F. Jacob und J. Monod, J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
S. Spiegelman und M. Hayashi, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 161 (1963)
W. Gilbert and B. Müller-Hill, Proc. Nat. Acad. Sci. 56, 1891 (1966)
M. Ptashne, Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 306 (1967)

2) D.L.D. Caspar, Adv. Protein Chem., Vol. 18, 37 (1963)

3) J. Takahashi, J. Biol. Chem., Vol. 240, PP.PC. 4117 (1965)

4) K. Brew, T.C. Vanaman und R.L. Hill, J. Biol. Chem. 242, 3747 (1967)

5) G. Braunitzer, K. Hilse, V. Rudloff und N. Hilschmann, Adv. Protein Chem., Vol. 19, 1 (1964)
W.A. Schroeder und R.T. Jones, Progress in the chemistry of organic natural products, Vol. XXIII, Springer-Verlag, Wien (1965)

6) L. Pauling, H.A. Itano, S.J. Singer und J.C. Wells, Science 110, 543 (1949)
V.M. Ingram, Nature 180, 326 (1957)

7) D.A. Marvin und H. Hoffmann-Berling, Nature 197, 517 (1963)
H. Hoffmann-Berling, D.A. Marvin und H. Dürwald, Z. Naturforschg. 18 b, 876 (1963)
D.A. Marvin und H. Hoffmann-Berling, Z. Naturforschg. 18 b, 884 (1963)
H. Hoffmann-Berling, H. Dürwald und I. Beulke, Z. Naturforschg. 18 b, 893 (1963)

8) R. Knippers und H. Hoffmann-Berling, J. Mol. Biol. 21, 293 (1966)
E.F. Rossomondo and N.D. Zinder, J. Mol. Biol. 36, 387 (1968)

9) G. Hobom und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 783, 797, 804 (1967)
F. Krug, Dissertation, München (1968)

10) T. Loeb, Science (Washington) 131, 932 (1960)
11) P.H. Hofschneider, Z. Naturforschg. 18 b, 203 (1963)
12) D.E. Bradley, J. gen. Microbiol. 35, 371 (1964)
13) W.O. Salivar, H. Tzagoloff und D. Pratt, Virology 24, 359 (1964)
14) H. Hoffmann-Berling, H.C. Kaerner und R. Knippers, Adv. Virus Res. 12, 329 (1966)
H. Hoffmann-Berling und R. Maze, Virology 22, 305 (1964)
15) D.S. Ray, H.-P. Bscheider and P.H. Hofschneider, J. Mol. Biol. 21, 473 (1966)
16) G. Braunitzer, Ber. Bunsengesellschaft 68, 733 (1964)
G. Hobom, Dissertation, München (1965)
17) R. Knippers und H. Hoffmann-Berling, J. Mol. Biol. 21, 281 (1966)
18) M.H. Adams, Bacteriophages (New York, 1959)
19) W. Arber, J. Mol. Biol. 20, 483 (1966)
20) G. Braunitzer, G. Hobom und K. Hannig, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 338, 276, 278 (1964)
21) K. Hannig, Z. analyt. Chem. 181, 244 (1960)
22) G. Braunitzer und G. Bauer, Z. Naturwiss. 54, 70 (1967)
23) H. Schuster, G. Schramm und W. Zillig, Z. Naturforschg. 11 b, 339 (1956)
24) V. Braun und W.A. Schroeder, Arch. Biochem. and Biophys. 118, 241 (1967)
25) J.R. Shelton und W.A. Schroeder, J. Amer. Chem. Soc. 82, 3342 (1960)
26) A.D. Gounaris und G.E. Perlmann, J. Biol. Chem. 242, 2739 (1967)
27) L.F. Cavalieri, J.F. Tinker und G.B. Brown, J. Amer. Chem. Soc. 71, 3973 (1949)
28) G.H. Beaven und E.R. Holiday, Adv. Protein Chem. 7, 319 (1952)
29) R.L. Hill und W.R. Schmidt, J. Biol. Chem. 237, 389 (1962)
30) R.L. Hill, Adv. Protein Chem. 20, 44 (1965)

31) E. Schallenberg und M. Calvin, J. Amer. Chem. Soc. 77, 2779 (1955)
F. Weygand und E. Csendes, Angew. Chem. 64, 136 (1952)
32) A.F.S.A. Habeeb, H.G. Cassidy und S.J. Singer, Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 29, 587 (1958)
33) P. Urnes und P. Doty, Adv. Protein Chem. Vol. 16, 401 (1961)
34) H. Matsubara, R. Susaki, A. Singer und T.H. Jukes, Arch. Biochem. Biophys. 115, 324 (1966)
35) P.J.G. Butler, J.I. Harris, B.S. Hartley und R. Leberman, Biochem. J. 103, 78p (1967)
36) L.A. Day, J. Mol. Biol. 15, 395 (1966)
37) E.R. Blout, I. Schmier und N.S. Simmons, J. Amer. Chem. Soc. 84, 3193 (1962)
38) S.E. Bresler, V.P. Kushner und S.Y. Frenkel, Biokhimiya 24, 685 (1959)
39) H.A. Scheraga, R.A. Scott, G.I. Loeb, A. Nakajima und J. Hermans Jr., J. Phys. Chem. 65, 699 (1961)
40) F. Sanger und H. Tuppy, Biochem. J. 49, 463, 481 (1951)
F. Sanger und E.O.P. Thompson, Biochem. J. 353, 366 (1953)
41) V. Rudloff und G. Braunitzer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 323, 129 (1961)
42) I. Smith, Nature 171, 43 (1953)
43) P. Edman und J. Sjöquist, Acta Chem. Scand. 10, 1507 (1956)
44) G.R. Stark und D.G. Smyth, J. Biol. Chem. 238, 214 (1963)
45) H. Fraenkel-Conrad, J.I. Harris und A.L. Levy, Methods Biochem. Anal. 2, 339 (1955)
46) Y. Ohta und Yumiko, J. Biol. Chem. 262, 509 (1967)
K. Morihara und H. Tsuzuki und T. Oka, Arch. Biochem. Biophys. 123, 572 (1968)
47) J. R. Brown und B.S. Hartley, Biochem. J. 101, 214 (1966)
48) R.J. Block, E.L. Durrum und G. Zweig, Paperchromatography and Paperelectrophoresis, Academic Press, New York (1958), p. 128 - 139

49) F. Reindel und W. Hoppe, Ber. 87, 1103 (1954)

50) V.M. Ingram, Biochim. Biophys. Acta 28, 593 (1958)

51) D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)

52) F.A. Anderer, B. Wittmann-Liebold und H.G. Wittmann, Z. Naturforschg. Vol. 20B, PP. 1203 - 1213 (1965)
B. Wittmann-Liebold und H.G. Wittmann, Z. Vererbungsl. Vol. 94, PP. 427 - 435 (1963)

53) G. Braunitzer, N. Hilschmann, V. Rudloff, K. Hilse, B. Liebold und R. Müller, Nature 190, 480 (1961)

54) D.A. Marvin, J. Mol. Biol. 15, 8 (1966)

55) R. Schwyzer und P. Sieber, Helv. Chim. Acta, Vol. 49, 134 (1966)
M. Rittel, M. Brugger, B. Kamber, B. Riniker und P. Sieber, Helv. 51, 924 (1968)
E. Wünsch, Z. Naturforschg. 22 b, 1269 (1967)

Lebenslauf

Am 14. Mai 1941 wurde ich in Leutersdorf/Oberlausitz als zweiter Sohn von Dr. Erich Beyreuther und seiner Ehefrau Ilse, geb. Bäuerle, geboren.

Die Grundschule und die ersten zwei Jahre der Oberschule besuchte ich im Bezirk Dresden. Das Zeugnis der Reife erhielt ich von der Helmholtz-Oberschule in Leipzig im Jahre 1959.

Nach dem Besuch der Oberschule arbeitete ich ein Jahr in einer Farben- und Lackfabrik als "Produktionsarbeiter" in Leipzig.

1960 legte ich eine Ergänzungsprüfung zum Abitur (Sonderprüfung) an der Luitpold-Oberrealschule in München ab. Im Wintersemester 1960/61 begann ich das Studium der Chemie an der Universität München, wo ich im Mai 1963 das Diplomchemiker-Vorexamen und im Juni 1965 das Diplomchemiker-Hauptexamen ablegte.

Seit Juli 1965 bin ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München in der Abteilung von Professor Dr. G. Braunitzer mit der Anfertigung meiner Diplom- und Doktorarbeit beschäftigt.